

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001年5月3日 (03.05.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/30994 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09, 15/55, 1/21, 9/78, C12P 13/02, C07K 14/37 (74) 代理人: 弁理士 志賀正武, 外 (SHIGA, Masatake et al.); 〒169-8925 東京都新宿区高田馬場三丁目23番3号 ORビル Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/07464
- (22) 国際出願日: 2000年10月25日 (25.10.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平 11/303212  
1999年10月26日 (26.10.1999) JP  
特願2000/21797 2000年1月26日 (26.01.2000) JP  
特願2000/107855 2000年4月10日 (10.04.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 昭和電工株式会社 (SHOWA DENKO K. K.) [JP/JP]; 〒105-8518 東京都港区芝大門一丁目13番9号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 青木裕史 (AOKI, Hirobumi) [JP/JP]. 蒲池晴美 (KAMACHI, Harumi) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内 Chiba (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL RHODOCOCCUS, RHODOCOCCUS-ORIGIN NITRILASE GENE, NITRILEHYDRATASE GENE AND AMIDASE GENE AND PROCESS FOR PRODUCING CARBOXYLIC ACIDS BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規ロドコッカス属細菌、ロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子、ニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子、およびそれらを用いたカルボン酸類の製法

(57) Abstract: A novel rhodococcus and a process for producing carboxylic acids by hydrolyzing cyano group of nitrile compounds by using this bacterium. A process for producing carboxylic acids (in particular, cyanocarboxylic acids) by using transformants having been transformed by plasmids containing rhodococcus-origin nitrilase gene, nitrilehydratase gene and amidase gene showing an excellent site-selectivity to cyano group of aromatic polynitrile compounds; these transformants, plasmids, genes and a process for producing enzymes by using these transformants thus obtained. The carboxylic acids (in particular, cyanocarboxylic acids) thus obtained are useful as starting materials in the synthesis of drugs, pesticides, dyes and other chemical products.

[続葉有]

WO 01/30994 A1



---

(57) 要約:

本発明は、新規ロドコッカス属細菌およびその細菌を用いてニトリル化合物のシアノ基を加水分解して対応するカルボン酸類を製造する方法に関する。本発明はまた、芳香族ポリニトリル化合物のシアノ基に対して特に優れた位置選択性を示す、ロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子、ニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドで形質転換した形質転換体を用いるカルボン酸類、特にシアノカルボン酸類の製法、該形質転換体、該プラスミド、該遺伝子、該形質転換体を用いる酵素の製法、およびそれにより得られた酵素に関する。本発明により得られるカルボン酸類、特にシアノカルボン酸類は、医薬、農業、染料、その他化学品の合成原料として有用である。

## 明 細 書

新規ロドコッカス属細菌、ロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子、ニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子、およびそれらを用いたカルボン酸類の製法

### 関連出願との関係

この出願は、米国特許法第111条(b)の規定に従い2000年2月22日に提出された米国仮出願第60/183754号および2000年2月22日に提出された米国仮出願第60/183821号の出願日の利益を米国特許法第119条(e)(i)により主張する米国特許法第111条(a)の規定に基づく出願である。

### 技術分野

本発明は、新規ロドコッカス属細菌およびその細菌を用いてニトリル化合物のシアノ基を加水分解して対応するカルボン酸類を製造する方法に関する。本発明はまた、芳香族ポリニトリル化合物のシアノ基に対して特に優れた位置選択性を示す、ロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子、ニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドで形質転換した形質転換体を用いるカルボン酸類、特にシアノカルボン酸類の製法、該形質転換体、該プラスミド、該遺伝子、該形質転換体を用いる酵素の製法、およびそれにより得られた酵素に関する。本発明により得られるカルボン酸類、特にシアノカルボン酸類は、医薬、農薬、染料、その他化学品の合成原料として有用である。

### 背景技術

ニトリル化合物のシアノ基を加水分解し対応するカルボン酸類を得る反応は、簡便にカルボン酸類を得る方法として種々検討がなされている。

1分子中に複数のシアノ基を含むポリニトリル化合物の、一部のシアノ基のみを生物的に加水分解し、対応するシアノカルボン酸を得る反応、特に、芳香族ポ

リニトリル化合物の特定のシアノ基のみを選択的に加水分解することにより、芳香族シアノカルボン酸類を得る方法について、微生物の反応の特異性を生かした反応が多数報告されている。例えば米国特許第 4,629,700 号では、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*) の細菌を用いた、フタロニトリル類からシアノ安息香酸類の製法が開示されている。また例えば欧州特許第 178,106 号では、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*) を含む 4 属のグラム陽性細菌を用いた、ポリニトリル化合物からの選択的シアノ基加水分解によるシアノカルボン酸類、及びシアノカルボン酸アミド類の製法が開示されている。

このような選択的シアノ基加水分解反応を、化学合成的に実施するためには、特定のシアノ基の保護など複雑な手順が必要であり、実用的ではない。

一般に選択性が高いといわれる生物的反応も、詳細に検証すれば、厳密には副反応による不純物を伴っている場合が多い。例えば上記のロドコッカス属細菌を用いたフタロニトリルからシアノ安息香酸の製法においては、選択率は 100 %ではなく、いずれも、1.0 %から数%の、フタロニトリル由来の副生物を伴っている。これらは原料からの転換率としては優れた方法と言えるが、特に医薬合成や、精密有機合成の出発原料としてみた場合、わずかな副生物の挙動が、結果的にそれを原料として合成された物質の性能や安全性に大きく影響する場合が少なくないことを考慮すれば、十分とは言えないものである。

製品の純度を高めるための方法として、産物を取得後、さらに精製を加えることが考えられる。しかしながら、例えば芳香族ポリニトリルから生物的にシアノカルボン酸を生成する過程で産生する種々の副生物は、相互に沸点、疎水度などの物性値が酷似しており、通常用いられる蒸留や抽出、塩析といった精製方法では完全には分離され難い。

このように、従来のニトリル化合物の微生物を用いた加水分解反応によってカルボン酸類を製造する方法において、加水分解反応そのものの選択率は十分ではなく、副生物の生成量が十分低減されているとはいえない。

また、ニトリル化合物の加水分解によってカルボン酸類を製造する別な方法として、ニトリラーゼ、或いはニトリルヒドラーターゼとアミダーゼとを用いる酵素的反応法がある。



ニトリラーゼはニトリル化合物をカルボン酸に変換する反応を触媒する酵素であり、ニトリル化合物から医薬原料等に有用なカルボン酸を得る手段として有用である。当該酵素を産生する微生物としては、例えば Fusarium solani (Biochem. J. 167, 685-692 (1977))、Nocardia sp. (Int. J. Biochem. 17, 677-683 (1985))、Arthrobacter sp. (Appl. Environ. Microbiol. 51, 302-306 (1986))、Rhodococcus rhodochrous J1 (Eur. J. Biochem. 182, 349-356 (1989))、Rhodococcus rhodochrous K-22 (J. Bacteriol. 172, 4807-4815 (1990))、Rhodococcus rhodochrous PA-34 (Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 184-190 (1992))、Rhodococcus sp. ATCC39484 (Biotechnol. Appl. Biochem. 15, 283-302 (1992)) 等を挙げることができる。

また、これらの微生物からはニトリラーゼあるいはニトリルヒドラターゼやアミダーゼが精製され、さらにはこれらの酵素の遺伝子工学的利用を計るため、その遺伝子が単離され一次構造が決定されているものもある。ニトリラーゼ遺伝子については、例えばロドコッカス属細菌由来の遺伝子が特開平7-99980号公報あるいは特開平9-28382号公報において開示されている。

近年、このような微生物がもつニトリル化合物の変換能を応用する試みがなされている。特に付加価値の高い化合物の製造に利用するために、立体選択性や位置選択性に優れた酵素が望まれている。例えば、特開平2-84198号公報には光学活性な $\alpha$ -置換有機酸の製造に用いる微生物について、特開平4-341185号公報には光学活性な2-ヒドロキシカルボン酸の製造に用いる微生物について、EP0433117号には光学活性なケトプロフェンの製造に用いる微生物についてそれぞれ開示されている。

このような微生物のうち、ロドコッカス sp. (Rhodococcus sp.) ATCC39484株は複数のシアノ基を有する芳香族ポリニトリル化

合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつことが報告されている（US 5 566 25）。この選択的なニトリル分解酵素系によって生成されるシアノ基とカルボキシル基を分子内に持つ化合物は医薬製造の合成材料として極めて有効である。しかしながら、本菌のもつニトリラーゼの芳香族ポリニトリル化合物に対する活性は比較的低く、この特性を工業的に利用するためには、反応を触媒する酵素の生産性向上が必須であった。しかし、これらの改変に必要不可欠な本菌のニトリラーゼ遺伝子は明らかにされていなかった。

ニトリルヒドラーターゼおよびアミダーゼはそれぞれニトリル化合物をアミドに、アミドをカルボン酸に変換する反応を触媒する酵素である。ニトリルヒドラーターゼおよびアミダーゼを用いることによってニトリル化合物から、医薬原料等に有用なアミドまたはカルボン酸を得ることができる。ニトリル化合物をそれぞれ相当するアミドまたはカルボン酸に変換する方法が生体触媒の利用によって開発され、このような触媒能をもつ微生物が数多く報告されている（特公昭56-17918号公報、特公昭59-37951号公報、特公昭61-162193号公報、特公昭61-21519号公報、特公昭64-86889号公報、特公平4-197189号公報、特開平2-470公報、EP 0 444 640など）。

また、これらの微生物からはニトリルヒドラーターゼやアミダーゼあるいはニトリラーゼが精製され、さらにはこれらの酵素の遺伝子工学的利用を計るため、その遺伝子が単離され一次構造が決定されている。ニトリルヒドラーターゼ遺伝子については、例えばロドコッカス属細菌由来の遺伝子が米国特許第2840253号やEP 0 445 646（特開平4-211379号公報）において、シュードモナス属細菌由来の遺伝子が特開平3-251184号公報において、リゾビウム属細菌由来の遺伝子が特開平6-25296号公報や特開平6-303971号公報において、またアミダーゼ遺伝子については、例えばブレバクテリウム属細菌とロドコッカス属細菌由来の遺伝子がEP 0 433 117において開示されている。また、ロドコッカス・エリスロポリス由来の遺伝子がEur. J. Biochem. 217 (1), 327-336 (1993)において、シュードモナス属細菌由来の遺伝子がFEBS Lett. 367, 275-279 (1995)において報告されている。

さらにロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子およびアミダーゼ両遺伝子を含む組換え体プラスミドに関する発明が特開平5-68566号公報において開示されている。

近年、このような微生物がもつニトリル化合物の変換能を応用する試みがなされている。特に付加価値の高い化合物の製造に利用するために、立体選択性や位置選択性に優れた酵素が望まれている。例えば、特開平2-84198号公報には光学活性な $\alpha$ -置換有機酸の製造に用いる微生物について、特開平4-341185号公報には光学活性な2-ヒドロキシカルボン酸の製造に用いる微生物について、EP0433117には光学活性なケトプロフェンの製造に用いる微生物についてそれぞれ開示されている。

このような微生物のうち、ロドコッカス sp. (Rhodococcus sp.) ATCC 39484株は複数のシアノ基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつことが報告されている (US 556625)。この選択的なニトリル分解酵素系によって生成されるシアノ基とアミド基、シアノ基とカルボキシル基を分子内に持つ化合物は医薬製造の合成材料として極めて有効であるが、本菌の持つニトリル変換活性は工業的に利用するためには低く、反応を触媒する酵素の生産性を向上させることが望まれていた。しかし、これらの改良に必要不可欠な本菌の関連酵素遺伝子はニトリルヒドラーゼ、アミダーゼのいずれについても明らかにされていなかった。

#### 発明の開示

本発明は、上記のような背景から、ニトリル化合物のシアノ基を微生物を用いて加水分解し対応するカルボン酸類を製造する方法において、従来よりも高い収率の加水分解反応で副生物の量を低減したカルボン酸類の製法を提供すること、さらにポリニトリル化合物の特定のシアノ基のみを選択的に加水分解し対応するシアノカルボン酸類を製造する方法において、従来よりも高い収率の加水分解反応で副生物の量を低減したシアノカルボン酸類の製法、及び上記反応を触媒する変異微生物を提供することを目的とする。

本発明の他の目的は、ロドコッカス属細菌由来の新規なニトリラーゼ遺伝子、

ニトリルヒドラターゼ遺伝子及びアミダーゼ遺伝子を提供することにある。また、本発明の別な目的は、遺伝子工学的手法を用いてこれらの遺伝子を組み込んだプラスミドで形質転換した形質転換体を用いて、効率良くカルボン酸類を生産する方法を提供することにある。更に、本発明の別な目的は、該形質転換体、該プラスミド、該遺伝子、該形質転換体を用いる酵素の製法、およびそれにより得られた酵素を提供することにある。

発明者らは、従来の微生物によるシアノ基の加水分解反応の副反応による副生物の本質的な低減を目指し鋭意検討を重ねた。特に、フタロニトリル類から、シアノ安息香酸類を生成する公知の様々な手法において生じる副生物を詳細に解析した結果、この反応による主要な副生物は、シアノベンズアミド、ならびにシアノベンズアミドから更に加水分解されたフタル酸モノアミドであることを見いだした。さらに、ニトリルをアミドに変換する能力を欠損または低下させた微生物を同反応に用いることにより、これら副生物を大幅に低減することができることを見いだした。

例えば小林らの報告（日本農芸化学会誌 Vol.71, No.12, 1997）などにより、微生物がニトリル化合物をカルボン酸まで加水分解する経路としては、（１）ニトリラーゼによる一段階の反応経路、（２）ニトリルヒドラターゼとアミダーゼの二つの酵素による、一旦アミド体を經由する二段階の反応経路、の２種類が存在することが知られている。

発明者らは、公知のニトリル変換細菌であるロドコッカス *sp.* ATCC 39484株を用いて、本菌株がポリニトリル化合物をシアノカルボン酸に変換する反応経路に関する詳細な検討を行った。本菌株は菌体懸濁反応により、フタロニトリルから主産物としてシアノ安息香酸を生成するが、同時に副生物としてシアノベンズアミド、ならびにフタル酸モノアミドを生成することを確認した。さらに検討の結果、本微生物のフタロニトリル加水分解には前記の２種類の経路の両方が拮抗して機能していることが推測された。そして、通常、ニトリルの加水分解によるカルボン酸生成に有用と考えられてきたアミド経路の活性をむしろ欠損または低下することで、問題の副生物であるシアノベンズアミド、ならびにシアノベンズアミドから更に加水分解されたフタル酸モノアミドを同時に削減また

は低減できるとの考えに至った。

A T C C 3 9 4 8 4 株を親株として、N T G (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) を用い常法に従い変異株集団を作製した。前述の、アミド体を経由する二段階経路が、一連の制御を受けているとの仮定に基づき、ベンズアミドを唯一炭素・窒素源として生育しないことを指標に、これら変異株集団より鋭意スクリーニングを行った。多数の非生育株を取得し実際に表記反応に供した結果、フタロニトリルとの反応においてシアノベンズアミド、ならびにフタル酸モノアミドの生成が著しく低減された新規な細菌、S D 8 2 6 株を取得したことで本発明を完成した。

本発明の一態様は、ニトリル化合物の少なくとも1つのシアノ基を、微生物を用いてカルボキシル基に変換してカルボン酸類を製造する方法において、シアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または低減した変異微生物を用いてニトリル化合物をカルボン酸類に変換することを含むことを特徴とするカルボン酸類の製法を提供する。

上記変異微生物は、ロドコッカス属細菌の変異株として良い。さらに上記ロドコッカス属細菌の変異株は、ロドコッカス *sp.* A T C C 3 9 4 8 4 を親株とする変異株として良い。さらに好ましい実施態様において、ロドコッカス *sp.* A T C C 3 9 4 8 4 を親株とする変異株は、ロドコッカス *sp.* S D 8 2 6 (F E R M B P - 7 3 0 5) として良い。

上記方法において、ニトリル化合物は、分子内に複数のシアノ基を有するポリニトリル化合物として良く、またカルボン酸類は、シアノカルボン酸類として良い。好適な実施態様において、上記ポリニトリル化合物は芳香族ポリニトリル化合物であり、シアノカルボン酸類は芳香族シアノカルボン酸類である。さらに好ましくは、芳香族ポリニトリル化合物は、オルトフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、芳香族シアノカルボン酸類は、オルトシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である。

本発明の別な態様は、シアノ基をカルボキシル基に変換する能力を有し、かつシアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または低減した変異微生物を提供する。該変異微生物は、ロドコッカス属細菌の変異株として良い。さらに好適な実

施態様において、該変異微生物は、ロドコッカス *sp.* ATCC 39484 の変異株である。

本発明の別な態様は、ロドコッカス *sp.* SD 826 (FERM BP-7305) 株を提供する。このロドコッカス *sp.* SD 826 は、1999年10月12日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託されている（受託番号：FERM BP-7305）。

本発明の別な態様は、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法を提供する。

本発明の別な態様は、配列表の配列番号1で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法を提供する。

本発明の別な態様は、上述した形質転換体を用いてポリニトリル化合物の少なくとも1つをカルボキシル基に変換することを含むシアノカルボン酸類の製法を提供する。

これらの製法において、ポリニトリル化合物は、芳香族ポリニトリル化合物として良い。好ましくは、芳香族ポリニトリル化合物は、オルトフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、シアノカルボン酸類は、オルト、メタまたはパラシアノ安息香酸として良い。

本発明の別な態様は、上述した製法において用いられる、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

本発明の別な態様は、上述した製法において用いられる、配列表の配列番号1で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

本発明の別な態様は、上述した形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列

番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドを提供する。

本発明の別な態様は、上述した形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号1で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドを提供する。

本発明の別な態様は、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を提供する。

本発明の別な態様は、配列表の配列番号1で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を提供する。

上記ロドコッカス属細菌は、ロドコッカス *sp.* ATCC 39484株として良い。

本発明の他の態様は、上述した形質転換体を培養し、培養物からニトリラーゼを採取することを含むニトリラーゼの製法を提供する。

本発明の他の態様は、上記方法で作製されたニトリラーゼを提供する。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号4および5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーターゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をアミド基に変換することを含むアミド類の製法を提供する。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーターゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をアミド基に変換することを含むアミド類の製法を提供する。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、アミド類のアミド基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法を提供する。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された

形質転換体を用いて、アミド類のアミド基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法を提供する。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号4および5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法を提供する。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法を提供する。

本発明の他の態様は、ニトリル類が、オルトフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、アミド類がオルトシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミド、パラシアノベンズアミドである請求項26または27に記載のアミド類の製法を提供する。

上述した製法において、アミド類は、オルトシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミド、パラシアノベンズアミドとして良く、カルボン酸類は、オルト、メタまたはパラシアノ安息香酸として良い。ニトリル類は、オルトフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルとして良く、カルボン酸類はオルト、メタまたはパラシアノ安息香酸として良い。

本発明の他の態様は、上述した方法に用いられる、配列表の配列番号4および/または5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

本発明の他の態様は、上述した方法に用いられる、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子



を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

本発明の他の態様は、上述した方法に用いられる、配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

本発明の他の態様は、上述した方法に用いられる、配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

本発明の他の態様は、上述した方法に用いられる、配列表の配列番号4および5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

本発明の他の態様は、上述した方法に用いられる、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を提供する。

本発明の他の態様は、上記形質転換体の調製用の配列表の配列番号4および/または5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子を含むプラスミドを提供する。

本発明の他の態様は、上記形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子を含むプラスミドを提供する。

本発明の他の態様は、上記形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドを提供する。

本発明の他の態様は、上記形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドを提供する。

本発明の他の態様は、上記形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号4および/または5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドを提供する。

本発明の他の態様は、上記形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドを提供する。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号4および5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子を提供する。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなる、ロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子を提供する。

上記ロドコッカス属細菌は、ロドコッカス *sp.* ATCC 39484株として良い。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を提供する。

本発明の他の態様は、配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなる、ロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を提供する。

上記ロドコッカス属細菌は、ロドコッカス *sp.* ATCC 39484株として良い。

本発明の他の態様は、上記形質転換体を培養し、培養物からニトリルヒドラーゼを採取することを含むニトリルヒドラーゼの製法を提供する。

本発明の他の態様は、上記形質転換体を培養し、培養物からアミダーゼを採取することを含むアミダーゼの製法を提供する。

本発明の他の態様は、上記形質転換体を培養し、培養物からニトリルヒドラーゼおよび/またはアミダーゼを採取することを含むニトリルヒドラーゼおよび/またはアミダーゼの製法を提供する。

本発明の他の態様は、上記製法で作製されたニトリルヒドラーゼを提供する。

本発明の他の態様は、上記製法で作製されたアミダーゼを提供する。

本発明の他の態様は、上記製法で作製されたニトリルヒドラーゼおよび／またはアミダーゼを提供する。

本発明によれば、新規のロドコッカス属変異株を用いて、ニトリル化合物を原料として、簡便で効率よく高純度カルボン酸類を得ることができる。また、ポリニトリル化合物、特に芳香族ポリニトリル化合物を原料として、簡便で効率よく、高純度シアノカルボン酸類を得ることができる。

さらに本発明は、複数のシアノ基を有する芳香族ポリニトリル化合物に対し、優れた位置選択的加水分解能をもつ、ロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子、ニトリルヒドラーゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子を提供するものである。ロドコッカス属細菌由来のこれら遺伝子のDNA配列は、ニトリルヒドラーゼ、アミダーゼの遺伝子工学的手法を用いた効率的生産やタンパク質工学的手法を用いた酵素の改良などに不可欠なものであり、このようにして得た酵素は有用化合物の工業的生産への応用に期待できる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、コロニーハイブリダイゼーション（実施例4）で得られたポジティブクローンから調製したプラスミドの構造を示す概略図である。

図2は、ニトリラーゼ遺伝子発現プラスミドの構築を説明する概略図である。

図3は、テレフタルニトリル→パラシアノ安息香酸変換反応におけるパラシアノ安息香酸の蓄積カーブの比較を示すグラフである。

図4は、クローン株から調製したプラスミドの構造を示す概略図である。

図5は、発現用プラスミドの構築（1）を示す概略図である。

図6は、発現用プラスミドの構築（2）を示す概略図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### 1. カルボン酸類製造用変異微生物

本発明に用いられる、シアノ基を加水分解しアミド基に変換する能力を欠損または低減せしめた変異微生物を創製するための親株としては、一般に知られる、ニトリル化合物のシアノ基を加水分解する能力を持つ種々の微生物、特に、ニトリラーゼ活性を有し、なおかつニトリル化合物の水和反応によるカルボン酸生成反応における副生物がアミド体であるような微生物を用いることができる。ニトリル加水分解能を有することが知られる微生物の例としては、ロドコッカス (*Rhodococcus*)、ロドトルラ (*Rhodotorulla*)、フザリウム (*Fusarium*)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、アシネトバクター (*Acinetobacter*)、バチルス (*Bacillus*)、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、ミクロコッカス (*Micrococcus*)、バークホルデリア (*Burkholderia*)、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*)、ノカルディア (*Nocardia*)、アエロモナス (*Aeromonas*)、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*)、アクロモバクター (*Achromobacter*)、アスペルギルス (*Aspergillus*)、リゾビウム (*Rhizobium*) 等の各属に属する微生物がある。

例えばロドコッカス s p. A T C C 3 9 4 8 4 株を、通常知られるような微生物の培養方法にて培養し、得られた菌体に N T G (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン)、E M S (エチルメタンスルホン酸) 等のアルキル化剤、5-プロモウラシル等の塩基アナログ、アザセリンやアクリジンオレンジ等のインターカレーション剤など、一般に知られる変異誘起化合物、または紫外線を作用させ、変異微生物集団を調製する。

この変異微生物集団より、ニトリル化合物からアミド化合物を生成する能力が低下あるいは欠損した変異株を選抜する。変異株が、アミド化合物を生成する能力を低下あるいは欠損していることは、変異微生物株の培養菌体をニトリル化合物に作用させ、得られた生成物を、H P L C 等の分析方法により解析し、ニトリル化合物の分解に伴う対応するカルボン酸アミド体の生成の状況を観察することで知ることができる。

この際、発明者らは、膨大な変異微生物集団より、目的とする変異株を効果的に濃縮するため、アミド体を經由する二段階経路が一連の制御を受けているとの仮定に基づき、親株とした微生物が栄養源として生育することができるようなアミド化合物、例えば A T C C 3 9 4 8 4 を親株とした場合にはベンズアミド等、

を資化し生育する能力の欠失もしくは低下を以て、アミドを経てカルボン酸に至る一連の反応経路の欠損または低下の指標とすることを考案した。この指標に基づき種々の方法により、目的の変異微生物を変異微生物集団より効率的に濃縮することが可能となった。

なお本発明において、「アミド化合物を資化し生育する能力を欠損もしくは低下した」とは、同一のアミド化合物を栄養源とした培養における微生物の倍加時間が、親株と比較し概ね2倍以上に延長、もしくは全く生育できなくなることを意味する。例えば、変異微生物集団を通常の栄養寒天培地、例えば、LB寒天培地等に塗抹し、生じたコロニーを個別に、ベンズアミドを唯一炭素・窒素源とする寒天培地に移植し、そこでの生育の良否を目視観察することで、ベンズアミド資化能の変化した変異株を検知することができる。また、いわゆるペニシリンスクリーニング法を適用し、ベンズアミドによる生育能が欠損または低下した変異微生物を濃縮することができる。すなわち、ベンズアミドを唯一炭素・窒素源とした培地に、微生物が分裂、増殖する過程に作用し微生物を死滅させるような薬剤、例えばペニシリンを添加し、そこに変異微生物集団を接種し培養することで、ベンズアミドで良好に生育する株が死滅し、ベンズアミドを資化し生育する能力の欠失もしくは低下した株が濃縮される。こうして濃縮された一群の変異微生物について、それぞれ、培養菌体をニトリル化合物、例えばATCC 39484を親株とした場合にはフタロニトリルに作用させ、得られた生成物を、HPLC等の分析方法により解析し、カルボン酸アミド体の蓄積が低減された株を探索する。このようにして濃縮された一群の変異微生物中には、カルボン酸アミド体の蓄積が増大した株とともに、蓄積が低減された株が見いだされる。

このようにして創出された変異株の一例として、ロドコッカス *sp.* SD 826株を挙げることができる。

ロドコッカス *sp.* SD 826株は、公知微生物であるロドコッカス *sp.* ATCC 39484 (米国 American Type Culture Collectionより分譲) から発明者らにより創出された株であり、該株は、工業技術院生命工学研究所に生命研寄託番号FERM BP-7305として寄託されている。

また、例えば、本発明に適用される、アミド化合物を生成する能力を低下ある

いは欠損した変異微生物株は、遺伝子工学的手法を用い、アミド化合物の生成に関与する酵素または酵素の制御因子、ならびにこれらをコードする遺伝子領域を破壊または欠損することによって取得してもよい。具体的には、当該反応に寄与する酵素の関連遺伝子を単離・解析し、その塩基配列に相同性を持つ配列を組み込んだ遺伝子断片を微生物に導入し、染色体上の酵素関連遺伝子との間で相同組み換えを誘起させ、塩基配列の挿入や欠失を生じさせることにより達せられる。

本発明に適用される微生物は、アミド化合物を生成する能力が低下あるいは欠損された微生物である。このような低下あるいは欠損をもたらす微生物の改変操作が、微生物の他の特性、特に、相互に関連の深いと考えられる、カルボン酸の生成能力に影響を与えることがある。但し、本発明の解決すべき課題に従えば、アミド化合物の生成が、得られるカルボン酸に対し相対的に低減されていればよく、こうした改変によりカルボン酸の生成能力が少なくとも改変前の親株に比べ低下していないことは望ましいが、アミド化合物の生成が相対的に低減される範囲において、カルボン酸の生成能力は変化してもよい。

本発明の反応は、前記のごとく創出された変異微生物を用い、通常のシアノ基加水分解活性を持つ微生物によるカルボン酸生成反応と同様の、一般的な微生物を用いた変換反応として実施することができる。例えば、SD 826株を1%ペプトンなどの栄養培地で、20℃～40℃、望ましくは25℃～30℃の温度で24時間程度培養し、得られた培養液に、ニトリル化合物を1ppm～50%、望ましくは10ppm～10%添加し、引き続き同様の温度で1時間～200時間程度攪拌し続けることにより達せられる。なお添加されるニトリル化合物は必ずしも全量が溶解していなくてもよいが、反応液中での溶解性や分散性を改善するような溶媒、界面活性剤等を添加することもできる。また反応の進行によるニトリル化合物の消費に応じて、連続的あるいは間欠的にニトリル化合物を添加してもよく、この場合のニトリル化合物の反応液中濃度は前記の限りではない。

微生物を培養するための培地炭素源としては、グルコースやシュークロース、フルクトース、廃糖蜜等の糖類、エタノールや酢酸、クエン酸、コハク酸、乳酸、安息香酸、脂肪酸などの有機物又はこれらのアルカリ金属塩、n-パラフィンなどの脂肪族炭化水素類、芳香族炭化水素類、また例えばペプトン、肉エキス、かつ

おエキス、大豆粉、ふすま等の天然有機物を、単独、あるいはこれらの組み合わせにより、通常 0.01 % ~ 30 %、望ましくは 0.1 % ~ 10 % 程度の濃度で用いることができる。

微生物を培養するための培地窒素源としては、例えば硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの無機窒素化合物、また尿素、尿酸などの含窒素有機物、ペプトン、肉エキス、魚エキス、大豆粉、等の天然有機物を単独、あるいはこれらの組み合わせにより、通常 0.01 % ~ 30 %、望ましくは 0.1 % ~ 10 % 程度の濃度で用いることができる。またこれら菌株によりシアノ基が加水分解を受けカルボン酸となるような反応原料は、培養中にあらかじめ添加しておくことにより、反応の進行と共に加水分解により遊離するアンモニウムイオンが微生物の窒素源となることから有用である。

さらに必要に応じて、リン酸 2 水素カリウム等のリン酸塩、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、酢酸カルシウム、塩化マンガン、硫酸銅、硫酸亜鉛、硫酸コバルト、硫酸ニッケルなどの金属塩が菌の生育改善のために添加される。添加濃度は培養条件により異なるが、通常、リン酸塩に関しては 0.01 % ~ 5 %、マグネシウム塩においては 10ppm ~ 1 %、他の化合物では 0.1ppm ~ 1000ppm 程度である。また選択する培地により、ビタミン類、アミノ酸、核酸などの供給源として例えば酵母エキス、カザミノ酸、酵母核酸を 1ppm ~ 100ppm 程度添加することにより、菌の生育を改善することができる。

また、菌のシアノ基に対する反応性を向上するために、シアノ基加水分解酵素の誘導源として培養中にニトリル化合物、例えばベンゾニトリルなどを 10ppm ~ 1 % 添加することは有用である。さらに、誘導源をかねて、反応原料となるニトリル化合物を、培養開始時点から添加しておくことも有用である。

いずれの成分を用いた場合も培地の pH は、5 ~ 9、望ましくは 6 ~ 8 に調整されることが望ましい。また以上のごとき培地であらかじめ培養された微生物菌体を、遠心分離、膜ろ過などの方法により培養液から分取し、反応原料であるニトリル化合物を含む水、生理食塩水、または培養の pH と同様に調整されたリン酸、酢酸、ホウ酸、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンなどとこれらの塩よりなる緩衝液等に再度懸濁し、反応することは、反応液中の夾雑物を低減し、

のちの生成物の分取を簡便にするために有用である。反応中のpHは、十分な濃度の緩衝液を用いる場合においては通常維持され得るが、反応の進行により上記pHを逸脱する場合においては、水酸化ナトリウム、アンモニアなどを用い適宜調整することが望ましい。

反応液中に生成したシアノカルボン酸は、その反応液中での性状により、遠心分離、膜ろ過、減圧乾燥、蒸留、溶媒抽出、塩析、イオン交換、各種クロマトグラフィーなど通常用いられる方法で分取される。最も簡便には、反応液を酸性に調整することによりシアノカルボン酸を析出させ、沈殿を遠心分離またはろ過することにより回収することができる。なお反応生成物が水溶液として得られる場合は、生成物が溶解した条件下で、遠心分離、膜ろ過などの方法により、微生物菌体を除去しておくことが好適である。また反応生成物が固形物として得られる場合は、結晶が十分に大きい場合はステンレス、ナイロン等のメッシュを用いて生成物を分取することができる。結晶が微生物との分別が困難な程度に微少な場合は、それらが溶解するような条件、例えばアルカリ条件下などにより一度水溶液として、遠心分離、膜ろ過等の方法により菌体を除去し、しかる後に条件を回復し再度沈殿させ分取する方法は好適である。ただし反応液の直接蒸留など、微生物が除かれることが自明な手法をとることができる場合においてはこの限りではない。

反応生成物の性質によっては、反応液中に生成物が蓄積することにより、反応速度が低下する場合がある。

このような場合は、生成物の濃度に応じて反応液中に、水、生理食塩水、反応緩衝液を追加し連続的に希釈してゆく方法が好適である。また反応速度が低下した時点で菌を分取し、上清を生産物溶液として回収し、分取した菌は再度反応原料を含む溶液あるいは懸濁液に戻すことにより、反応速度を回復することができる。

これらの方法は、微生物のニトリル加水分解活性が維持される範囲において、何回でも繰り返すことができる。

本発明はさらに、本発明に適用の微生物の、無細胞抽出液、さらに無細胞抽出液から上記反応を触媒する成分を濃縮・抽出したもの、等を用いても同様に実施



することができる。さらには、本反応に適用可能な微生物もしくはその抽出液、抽出成分を、難溶性の担体に固定化し、この固定化物を原料溶液に接触させることによって達成される。このような固定化担体としては、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリ-N-ビニルホルムアミド、ポリアリルアミン、ポリエチレンイミン、メチルセルロース、グルコマンナン、アルギン酸塩、カラギーナン等、更にこれらの重合、架橋化物など、微生物もしくはその抽出成分を包合した水難溶性の固形分を形成するような化合物を単独、もしくは混合して用いることができる。また、活性炭、多孔質セラミックス、グラスファイバー、多孔質ポリマー成型体、ニトロセルロース膜など、あらかじめ固形物として形成された物体上に微生物もしくはその抽出液、抽出成分を保持させたものを用いることもできる。

本発明の方法によるシアノ基の加水分解反応の基質特異性は広く、通常知られる種々のニトリル化合物、例えば脂肪族ニトリル、芳香族ニトリル、複素環式ニトリル、等を対象とし、高い選択率で対応するカルボン酸を得ることができる。

脂肪族ニトリルとしては、例えばアセトニトリル、プロピオニトリル、n-ブチロニトリル、イソブチロニトリル、n-バレロニトリル、イソバレロニトリル、カプロニトリル、マロノニトリル、サクシノニトリル、アジボニトリル、グルコノニトリル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル等が挙げられる。

また芳香族ニトリルとしてはベンゾニトリル、トルニトリル、オルトフタロニトリル、テレフタロニトリル、イソフタロニトリル、及びこれら芳香族ニトリル化合物の置換体、例えば塩素化物、フッ素化物、ニトロ化物、アミノ化物、等が挙げられる。

また複素環式ニトリルとしては、メタシアノピリジン、パラシアノピリジン、シアノインドール類、等が挙げられる。

また本発明によれば、上記のうち特に1分子中に複数のシアノ基を有するポリニトリル化合物を対象とし、高い選択率で対応するシアノカルボン酸を得ることができる。このようなポリニトリル化合物としては、例えば脂肪族ニトリルとしては、マロノニトリル、サクシノニトリル、アジボニトリル、グルコノニトリル等、また芳香族ニトリルとしてはオルトフタロニトリル、テレフタロニトリル、

イソフタロニトリル、及びこれら芳香族ニトリル化合物の置換体、例えば塩素化物、フッ素化物、ニトロ化物、アミノ化物等を挙げることができる。

本発明の副生物の量を低減したカルボン酸類の製法は、具体的には、生成物であるカルボン酸類中、原料ニトリル化合物に由来する副生物の全量が、0.5（モル）%以下で取得することができる。微量な化学物質が人体に与える影響が懸念されている昨今、化学反応における本質的な副反応の低減、そうした反応により得られる高純度の化学品が、産業上の新たな可能性を創製しうることを勘案したものである。

本発明のこの方法は、基本的にアミドを経由するカルボン酸の生成経路を欠損あるいは低減していることから、ニトリルの部分加水分解によるアミド体不純物、さらにその誘導体を実質的に生成しない。本発明により得られるカルボン酸類は、特に高純度が要求される分野、例えば医薬合成やファインケミカル分野の合成原料等の製法として好適である。

## 2. ロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子

ロドコッカス sp. のニトリラーゼ遺伝子のDNA配列の決定方法について次に説明する。例えば、ロドコッカス sp. ATCC 39484株染色体DNAは、例えばSaitoらの方法（Biochem. Biophys. Acta. 72, 619 (1963))を応用して調製することができる。遺伝子のクローニングに用いる染色体DNAライブラリーは、例えばpUC18などのプラスミドベクターを用いて作製することができる。ニトリラーゼ遺伝子のクローニングは、例えばSaikiらのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法（Science 230, 1350 (1985))を用いて行うことができる。この時、使用するPCR用プライマーの一方は、ユニバーサルプライマー（フォワードまたはリバース）とし、他方は酵素N末端配列をコードするDNA配列から、適当な配列を選抜する。これらのプライマーを組み合わせ、染色体DNAライブラリーを鋳型としてアンカーPCRを行うことによって、目的酵素のコード配列断片を得ることができる。このアンカーPCR法で得たニトリラーゼコード配列DNA部分断片を全遺伝子領域スクリーニング用プローブとして使用すること

により、ロドコッカス *sp.* ATCC 39484株の染色体DNAライブラリーからニトリラーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを得ることができる。ニトリラーゼコード配列断片のDNA配列は、Sangerらによるdideoxy法(Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463 (1997))など公知の手法を用いて決定することができる。

得られた酵素構造遺伝子を用いてニトリラーゼ酵素を生産するためには、酵素構造遺伝子を適当な発現ベクター、例えばpUC18のlacプロモーターの下流に接続するなどして作製することができる。このようにして作製したプラスミドを用いて、例えば大腸菌JM101株(*Escherichia coli* JM101)などの宿主を形質転換する。この形質転換体を培養することにより、該ニトリラーゼが宿主細胞内に著量生産される。このニトリラーゼ酵素は菌体のまま変換反応に使用することもできるが、菌体を破碎して無細胞抽出液として、あるいは精製酵素として使用することもできる。

異種微生物由来の酵素遺伝子が、宿主微生物において実際に機能を果たす形で発現するには、実際に宿主微生物内でその遺伝子が保持・分裂されること、宿主の転写機能により転写を受けること、転写された情報が蛋白として翻訳されること、翻訳で生成したポリペプチドが機能を持ちうる高次構造にフォールディングされること、さらには、その酵素が基質に接触できるよう、ドナー微生物と同様に酵素が分泌されること、あるいは菌体内酵素であれば、宿主微生物がドナー微生物と同様の基質透過・運搬系を有すること、など様々な要件が満たされる必要があることは周知である。さらにその発現が産業上有用な程度であるためには、これら要件いずれもが高いレベルで満たされる必要がある。こうした課題の解決のため、通常は、プロモーター等調節領域の解析や改変、また複雑なシャトルベクター系を構築し、クローニングされた遺伝子をドナー微生物に戻すことで転写・発現系や種々の補助因子を目的遺伝子本体に適合させる、等の操作が必要になる。これらの方法は、改変すべき調節機構の解析対象や改変方法に関する情報を得ることが困難であり試行錯誤に頼る必要があること、またドナーに戻して発現させることにおいては、結局ドナーの能力に制限を受ける、等の問題がある。本発明者らの知るところによれば、異種微生物のニトリラーゼの発現が確認された

事例は存在するが、本発明のごとく、通常知られる大腸菌宿主・ベクター系に組み込み形質転換することにより、簡便に、ドナー微生物の能力を大幅に上回る高い活性を発現することができる、ポリニトリルの選択的加水分解を触媒するニトリラーゼの遺伝子を得た事例、またこのようなニトリラーゼ遺伝子を用いた組み換え体によるニトリル化合物、特に芳香族ポリニトリル化合物を対象とする選択的かつ高度な反応の事例は知られていない。

本発明の原料として用いるニトリル化合物は、シアノ基を1個含む脂肪族または芳香族の化合物、あるいは複数のシアノ基を含む脂肪族または芳香族のポリニトリル化合物である。オルトフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルを原料として用いると対応する高純度のオルト-、メタ-またはパラ-シアノ安息香酸を好ましく取得できる。

本発明の変換反応は、例えばリン酸緩衝液のごとき希薄水溶液に、原料となる物質と変換活性を有する菌体、無細胞抽出液、あるいは酵素を加え、pH 5～10、望ましくは6～8、温度15～45℃、望ましくは30～42℃で行うことができる。

反応液中に生成した生産物の取得方法は特に限定されないが、例えば、反応液の上清を分離回収した後、生産物の特性に応じて沈殿形成、抽出または蒸留等の方法を用いて、あるいはそれらの方法を組み合わせて取得できる。またカラムクロマトグラフィー等を用いて分離精製することにより高純度の生成物を得ることができる。

### 3. ロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子

ロドコッカス sp. ATCC 39484株染色体DNAは、例えばSaitoらの方法(Biochem. Biophys. Acta. 72, 619 (1963))を応用して調製することができる。遺伝子のクローニングに用いる染色体DNAライブラリーは、例えばpUC18などのプラスミドベクターを用いて作製することができる。ニトリルヒドラターゼ遺伝子とアミダーゼ遺伝子のクローニングは、例えばSaikiらのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法

(Science 230, 1350 (1985)) を用いて得られた部分断片をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションにより行うことができる。この時、使用するPCR用プライマーの一方は、ユニバーサルプライマー（フォワードまたはリバース）とし、他方は目的酵素タンパク質のN末端配列を解析し、それをコードする配列から、適当な配列を選抜する。これらのプライマーを組み合わせ、染色体DNAライブラリーを鋳型としてアンカーPCRを行うことによって、目的酵素のコード配列断片を得ることができる。このアンカーPCR法で得たニトリルヒドラーゼコード配列あるいはアミダーゼコード配列DNA断片を全遺伝子領域スクリーニング用プローブとして使用することにより、ロドコッカス sp. ATCC 39484株の染色体DNAライブラリーからニトリルヒドラーゼ遺伝子および／またはアミダーゼ遺伝子を含む組換え体DNAを得ることができる。ニトリルヒドラーゼコード配列断片およびアミダーゼコード配列断片のDNA配列は、Sangerらによるdideoxy法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 5463 (1997)) など公知の手法を用いて決定することができる。

得られた酵素構造遺伝子を用いて酵素を生産するためには、酵素構造遺伝子を適当な発現ベクター、例えばpUC18のlacプロモーターの下流に接続するなどして作製することができる。このようにして作製したプラスミドを用いて、例えば大腸菌JM101株 (Escherichia coli JM101) などの宿主を形質転換する。この形質転換体を培養することにより、該ニトリルヒドラーゼおよび／またはアミダーゼが宿主細胞内に著量生産される。この酵素は菌体のまま変換反応に使用することもできるが、菌体を破碎して無細胞抽出液として、あるいは精製酵素として使用することもできる。

異種微生物由来の酵素遺伝子が、宿主微生物において実際に機能を果たす形で発現するには、実際に宿主微生物内でその遺伝子が保持・分裂されること、宿主の転写機能により転写を受けること、転写された情報が蛋白として翻訳されること、翻訳で生成したポリペプチドが機能を持ちうる高次構造にフォールディングされること、さらには、その酵素が基質に接触できるよう、ドナー微生物と同様に酵素が分泌されること、あるいは菌体内酵素であれば、宿主微生物がドナー微

生物と同様の基質透過・運搬系を有すること、など様々な要件が満たされる必要があることは周知である。さらにその発現が産業上有用な程度であるためには、これら要件いずれもが高いレベルで満たされる必要がある。こうした課題の解決のため、通常は、プロモーター等調節領域の解析や改変、また複雑なシャトルベクター系を構築し、クローニングされた遺伝子をドナー微生物に戻すことで転写・発現系や種々の補助因子を目的遺伝子本体に適合させる、等の操作が必要になる。これらの方法は、改変すべき調節機構の解析対象や改変方法に関する情報を得ることが困難であり試行錯誤に頼る必要があること、またドナーに戻して発現させることにおいては、結局ドナーの能力に制限を受ける、等の問題がある。本発明者らの知るところによれば、異種微生物のニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼの遺伝子を得た事例、またこのようなニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼの発現が確認された事例は存在するが、本発明のごとく、通常知られる大腸菌宿主・ベクター系に組み込み形質転換することにより、簡便に、ドナー微生物の能力を大幅に上回る高い活性を発現することができる、ポリニトリルの選択的加水分解を触媒するニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼの遺伝子を得た事例、またこのようなニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼ遺伝子を用いた組み換え体によるニトリル化合物、特に芳香族ポリニトリル化合物を対象とする選択的かつ高度な反応の事例は知られていない。

本発明のカルボン酸類またはアミド類の製造法は、例えば原料となる化合物と、変換活性を有する菌体、無細胞抽出液あるいは酵素を、リン酸緩衝液のごとき希薄水溶液に加え、反応液pHを5～10、望ましくは6～8に保ち、反応温度を15～45℃、望ましくは30～42℃に保つことで行うことができる。反応液中に生成した生産物は、反応液の上清を分離回収した後、生産物の特性に応じて沈殿形成やカラムクロマトグラフィーを用いて得ることができる。

本発明のカルボン酸類またはアミド類の製造法の原料に用いられるニトリル類は、1分子中に少なくとも1個のシアノ基を有する脂肪族および芳香族の化合物である。オルトフタロニトリル、イソフタロニトリルおよびテレフタロニトリル等の芳香族ポリニトリル化合物が好ましく例示される。

本発明のカルボン酸類の製造法の原料に用いられるアミド類は、アミド基を有

する脂肪族および芳香族の化合物である。オルトシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミドまたはパラシアノベンズアミド等のシアノ基を有する芳香族アミド化合物が好ましく例示される。

以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### [実施例 1] 変異微生物の取得

ロドコッカス sp. ATCC 39484 株 (米国 American Type Culture Collection より入手)-を、LB 寒天培地に画線し、30 °C 恒温槽中で 24 時間培養した。生じたコロニーより 1 白金耳を掻き取り、LB 液体培地 5ml に接種、30 °C の振盪培養器にて 6 時間振盪培養した。菌体を 10,000g の遠心により回収し、等容の 50mM リン酸カリウム/ナトリウム緩衝液(pH7.0)で 3 回洗浄した後、等容の同緩衝液に再度懸濁した。

菌懸濁液に、2000ppm NTG (N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン) 溶液を、終濃度にして 100ppm となるよう添加しよく攪拌後、室温で 30 分間放置した。菌体を 10,000g の遠心分離により回収し、同緩衝液で 1 回洗浄後、菌体を少量の同緩衝液に再度懸濁し、全量を、0.1 % のベンズアミドを含む無機塩液体培地 5ml に接種した。無機塩培地の組成を以下に示す。

#### (無機塩培地)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.5 g/L
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1.5 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2 g/L
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 mg/L
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mg/L
酵母エキス	20 mg/L

30 °C、1.5 時間の振盪培養の後、1mg/L となるように、アンピシリンを添加し、更に 30 °C、12 時間振盪培養した。得られた培養液を 500 倍に希釈し、希釈液を、

L B 固体培地（直径 90mm シャーレ上）に各 0.1ml ずつ、300 枚に塗布した。30 °C、48 時間培養し、コロニーが生じた段階で、高圧滅菌したベルベットにコロニーを写し取り、各シャーレ毎に 0.1 %ベンズアミド、1.5 %寒天を含む上記組成の無機塩固体培地（直径 90mm）に転写し、30 °C、48 時間培養した。

転写元の L B 固体培地と、転写先の無機塩固体培地でのコロニー形成を比較し、L B で良好に生育し、無機塩固体培地で生育しない約 400 株を選抜した。これら選抜株を、転写元の L B から、滅菌した爪楊枝にて、新しい L B 固体培地に移植し、30 °C、24 時間培養した。生じた全てのコロニーについてそれぞれ上記の無機塩培地 5ml に接種し、さらにイソフタルニトリル 0.1 %を添加し 30 °C、48 時間反応した。同時に親株 A T C C 3 9 4 8 4 についても同様に培養し接種、反応を行った。それぞれの株について得られた反応液の上清を 100 倍に希釈し、逆相 H P L C（カラム：Shodex DS-613、溶離液：50 %アセトニトリル／5mM リン酸カリウム緩衝液 pH3.0、流速 1mL/min、検出：UV 210nm）に供した。うち 1 株（S D 8 2 6 株）は、親株 A T C C 3 9 4 8 4 同様、著量のメタシアノ安息香酸を検出したと同時に、親株の反応液に認められた、メタシアノベンズアミド、ならびにフタル酸モノアミドが顕著に低減していることを確認した。目的とする、副反応経路が欠損した株が得られたと考えられた。

次の表 1 に、本発明に係る新規ロドコッカス属細菌、ロドコッカス s p . S D 8 2 6 株（FERM BP-7305）の菌学的性質を記載した。

〔以下余白〕



表 1

**Rhodococcus** sp. SD 826 の菌学的性質

項目		性状
形態		多形性桿菌
グラム染色性		+
孢子		—
運動性		—
酸素に対する態度		好気性
オキシダーゼ		—
カタラーゼ		+
抗酸性		—
集落の色調		オレンジ色
rod-coccus cycle		+
アデニンの分解		+
チロシンの分解		+
尿素の分解		—
資化性	イノシトール	—
	マルトース	—
	マンニトール	+
	ラムノース	—
	ソルビトール	+
	p-クレゾール	—
	m-ヒドロキシ安息香酸	+
	ピメリン酸	+
	アジピン酸ナトリウム	+
	安息香酸ナトリウム	+
	クエン酸ナトリウム	+
	乳酸ナトリウム	+
	テストステロン	—
	L-チロシン	+
	ラクトース	—
	マンノース	+
	2,3-ブタンジオール	+
	グルコース	+
0.02% アジ化ナトリウム存在下での生育		—
10℃での生育		—
40℃での生育		+
45℃での生育		—

## [実施例 2]

ロドコッカス sp. SD826 を、LB 寒天培地に画線し、30 °C の恒温槽で 24 時間培養した。形成されたコロニーから、1 白金耳をかきとり、500mL 容のバッフル付きフラスコ中の LB 液体培地 100mL に懸濁した。フラスコを、30 °C の恒温回転振盪培養器に設置し、毎分 120 回転、24 時間培養した。得られた微生物菌体を、10,000g の遠心分離により回収し、培養液と等容の 50mM リン酸ナトリウム／カリウム緩衝液 (pH=7) に懸濁した。菌懸濁液にイソフタロニトリルを 5 % (質量/体積) 相当添加し、30 °C の恒温回転振盪培養器に設置し、毎分 120 回転、72 時間反応した。

得られた反応液を、2mol/l 塩酸を用いて pH2 とし、反応液と等容の酢酸エチルを添加し攪拌、抽出を行った。得られた酢酸エチル層を適宜希釈し、逆相 HPLC (カラム: Shodex DS-613、溶離液: 50 % アセトニトリル / 5mM リン酸カリウム緩衝液 pH3.0、流速 1mL/min、検出: UV 210nm) により分析した。反応液中に主成分としてメタシアノ安息香酸標品と保持時間が一致するピークを認めた。ピーク成分を分取し、GC-マススペクトル解析に供試し、それぞれ標品と同一の構造を示唆するフラグメントパターンを与えることを確認した。

比較例として、上記と同様の方法により、親株 ATCC 39484 株を用いて反応、抽出、分析を行った。親株反応液中の上記 HPLC 条件下における主要な生成物を、LC-MS 分析に供し、同定した。

親株及び SD826 の反応液中の、主要な各成分の濃度と、反応原料であるイソフタロニトリルからの推定変換率の比較、ならびに ATCC 39484 を基準とした、SD826 株の使用による副生物の低減率を表 2 に示す。

表 2

菌株名	メタシアノ安息香酸		メタシアノベンズアミド		イソフタル酸モノアミド	
	濃度(%)	変換率(mol%)	濃度(%)	変換率(mol%)	濃度(%)	変換率(mol%)
ATCC39484	5.638	98.22	0.023	0.40	0.087	1.34
SD826	5.721	99.67	0.003	0.06	0.016	0.24
副生物の低減率／成分別(%)			85		82	
副生物の低減率／総計(%)			83			

## [実施例3]

ロドコッカス sp. SD 8 2 6 を、LB 寒天培地に画線し、30 °C の恒温槽で 24 時間培養した。形成されたコロニーから、1 白金耳をかきとり、500mL 容のバッフル付きフラスコ中の LB 液体培地 100mL に懸濁した。フラスコを、30 °C の恒温回転振盪培養器に設置し、毎分 120 回転、24 時間培養した。得られた微生物菌体を、10,000g の遠心分離により回収し、培養液と等容の 50mM リン酸ナトリウム／カリウム緩衝液 (pH=7) に懸濁した。

菌懸濁液にテレフタルニトリルを 1 % (質量/体積) 相当、及び誘導基質としてベンゾニトリルを 0.1 % (質量/体積) 添加し、30 °C の恒温回転振盪培養器に設置し、毎分 120 回転、72 時間反応した。得られた反応液を、2 mol/l 塩酸を用いて pH2 とし、反応液と等容の酢酸エチルを添加し攪拌、抽出を行った。得られた酢酸エチル層を適宜希釈し、逆相 HPLC (カラム : Shodex DS-613、溶離液 : 50 % アセトニトリル / 5mM リン酸カリウム緩衝液 pH3.0、流速 1mL/min、検出 : UV 240nm) により分析した。反応液中に主成分としてパラシアノ安息香酸標品と保持時間が一致するピークを認めた。ピーク成分を分取し、GC-マススペクトル解析に供試し、それぞれ標品と同一の構造を示唆するフラグメントパターンを与えることを確認した。

比較例として、上記と同様の方法により、親株 ATCC 39484 株を用いて反応、抽出、分析を行った。親株反応液中の上記 HPLC 条件下における主要な生成物を、LC-MS 分析に供し、同定、定量した。

親株及び SD 8 2 6 の反応液中の、主要な各成分の濃度と、反応原料であるイソフタルニトリルからの推定変換率の比較、ならびに ATCC 39484 を基準とした、SD 8 2 6 株の使用による副生物の低減率を表 3 に示す。

[以下余白]

表 3

菌株名	パラシアノ安息香酸		パラシアノベンズアミド		テレフタル酸モノアミド	
	濃度(%)	変換率(mol%)	濃度(%)	変換率(mol%)	濃度(%)	変換率(mol%)
ATCC39484	1.129	98.31	0.006	0.53	0.012	0.97
SD826	1.145	99.68	n.d.	-	0.002	0.26
副生物の低減率／成分別(%)			100		83	
副生物の低減率／総計(%)			89			

n.d.: 検出されず

#### [実施例4] ニトリラーゼ遺伝子調製用染色体DNAの調製

Lプロス (ポリペプトン1%、NaCl 0.5%、酵母エキス 0.5%、pH 7.0) に2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地で一昼夜培養したロドコッカス sp. (以下、「R. sp.」と記す) ATCC39484株一白金耳を基本培地 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/l、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.75 g/l、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/l、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  10 mg/l、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5 mg/l、酵母エキス 20 mg/l) にグルコース5 g/l、尿素2 g/lを加えた培地300mlで30℃、24時間培養した。培養後の菌体を集菌し、5mMのEDTA溶液100mlで菌体を洗浄した。この菌体を30mlの緩衝液 (20mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.1)) に懸濁し、60mgのリゾチームを加え37℃で2時間インキュベートした。この懸濁液を遠心分離 (5000 rpm, 7分間) して菌体を回収し、11.34 mlのTE Bufferに再懸濁し、10%SDS 0.6mlを加え、さらに100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるようにプロテナーゼK (メルク社製) を加え、1時間、55℃でゆるやかに振盪した。この溶液をフェノール抽出、エタノール沈殿することによって染色体DNAを調製した。

#### [実施例5] 染色体ライブラリーの作製

実施例4で得られた染色体DNA 20  $\mu\text{g}$  に対し制限酵素Sau3AIを用い

て部分消化を行った。即ち、染色体DNAを4  $\mu$ gずつ5本のチューブにとり、100  $\mu$ lの反応容量中で、制限酵素Sau3AI（宝酒造社製、4~12 U/ $\mu$ l）を添加し37°Cで反応させ、10秒毎にチューブの一本を取り、終濃度20 mMとなるようEDTAを加え反応を停止させた。このようにして調製した染色体DNAの部分消化断片溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、1~2 kbのDNA断片を泳動抽出およびエタノール沈殿にて回収し、30  $\mu$ lのTE溶液に溶解させた。この試料の9  $\mu$ lと1  $\mu$ gのBamHI消化後BAP処理したpUC18（宝酒造社製）とをT4DNAリガーゼ（宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2）を用いてライゲーションした後、大腸菌JM101株を形質転換した。このライブラリーの増幅ライブラリーを作製するために、大腸菌形質転換体を20コロニーずつアンピシリン50 ppmを含むLプロスに植菌し、一昼夜培養した菌体からアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出した。

#### [実施例6] アンカーPCR法

クローニングに先立ち、プローブとする酵素遺伝子部分断片を得るため、アンカーPCRを行った。酵素配列に由来する一方のプライマーは、公知の本酵素N末端配列から、適当なT<sub>m</sub>を持つように配列を選択して作製した。すなわち、5'-gct gcg gtg cag gca-3'（およびその相補鎖）、T<sub>m</sub>=52°C

PCR法は以下の反応条件で行った。

##### 反応液組成：

R. sp. ATCC 39484 染色体DNAライブラリー	1 $\mu$ g
ユニバーサルプライマー	100 pmol
酵素N末端プライマー	100 pmol
dNTP溶液	各1 mM
10x反応バッファー	10 $\mu$ l
Ex Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）	2.5 U
	計50 $\mu$ l

## 反応条件：

熱変性	94℃、45秒
アニーリング	37～55℃、60秒
伸長	72℃、60～90秒
サイクル数	24回

このようにして行った反応のうち、特異的に増幅される断片が見られた反応液を2%アガロースゲル電気泳動に供し、断片を含む部分のゲルを切り出し、ESAYTRAP ver. 2 (宝酒造社製) を用いて精製した。これらのDNA断片について、dideoxy法によりDNA配列を決定し、翻訳されたアミノ酸配列がR. sp. ATCC 39484株のニトリラーゼN末端配列と一致するものを探索した。その結果、得られた断片中に、ニトリラーゼ287アミノ酸をコードするDNA配列を含む約900bpの断片が見つかった。

## [実施例7] コロニーハイブリダイゼーション

実施例6で得られたニトリラーゼ遺伝子の一部を含むPCR断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法により全遺伝子のクローニングを行った。実施例2の方法に従ってSau3AIで分解した染色体DNAの部分消化断片溶液を1%のアガロースゲル電気泳動に供し、4～8kbのDNA断片を泳動抽出およびエタノール沈殿にて回収し、乾燥後30μlのTE溶液に溶解した。この試料溶液の9μlと、1μlのBamHI消化後BAP処理したpUC18 (宝酒造社製、100ng) とをT4DNAリガーゼ (宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2) を用いてライゲーションした後、大腸菌JM101株を形質転換し、イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) 0.1mM、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (X-gal) 0.004%、アンピシリン50ppmを含むLプロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に塗布して37℃で一昼夜培養した。

生じた白色コロニーを、アンピシリン50ppmを含むLプロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に釣菌し、37℃で一昼夜培養した。十分生育

した後、寒天平板培地を約2時間4℃に置き冷却した。乾いたナイロンメンブレン（アマシャム ファルマシア バイオテク社製、Hybond-N<sup>+</sup>）に上下左右の印を鉛筆で付けた後冷却した平板培地の上に静かに置き、メンブレンが全体に濡れてくるのを待って静かにかつ一気にはがし、平板上のコロニーをメンブレンに移し取った。移し取った菌体が少ない時は、メンブレンをアンピシリン50 ppmを含むLブロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に置き、37℃で一昼夜培養した。

菌体を移したメンブレンを3 mlのアルカリ溶液（NaOH 0.5 M）上に浮かせ、菌体を溶解した。溶解した菌体の残査を、5×SSCで20分間×2回洗浄して落とした。このメンブレンに対し、Random prime DNA labelling and detection system（アマシャム ファルマシア バイオテク社製）を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション検出の手順は、同キット添付のマニュアルに従って標準的な条件で行った。約4000コロニーに対して行ったハイブリダイゼーションの結果、2株のポジティブクローンが得られた。

これらのポジティブクローンからアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出し、プローブ用部分断片中にある制限酵素切断サイトの位置と、プラスミドの制限酵素分解パターンとを比較して、挿入断片中の遺伝子の位置と方向を推定した。その結果、2つのクローン株から調製したプラスミドpNL06およびpNL09は、ともに全ニトリラーゼ遺伝子を含んでいることが分かった（図1）。そこでより挿入断片長の長いP09株のプラスミド（pNL09）を用いて、diideoxy法により挿入断片約2.6 kbのDNA配列を決定した（配列番号：1）。プローブとして用いた部分断片配列と一致する部分を探索したところ、挿入断片端から約300 bp下流からlacプロモーターに対して正方向にニトリラーゼ遺伝子が存在していることが分かった。

この方向と位置は、制限酵素の切断サイトから推定した遺伝子の位置と方向に一致していた。このニトリラーゼ遺伝子配列から翻訳されたアミノ酸配列（配列番号2）は、既知のいずれのニトリラーゼのアミノ酸配列とも異なる新規なものであった。

## [実施例 8] ニトリラーゼ活性の測定

ニトリラーゼ活性は 20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 10 ml にテレフタルニトリル (TPN) を基質として 1 ~ 10 質量% を懸濁した反応液に、菌体 (湿体質量で 1 g 前後) を加えて 30 °C で振とうしながら反応を行い、一定時間毎に反応液中に生成したパラシアノ安息香酸を HPLC で定量することによって測定した。通常、反応液から固形物を遠心分離して除去した後、上清を溶離液で 100 倍希釈したものを HPLC サンプルとして用いた。パラシアノ安息香酸の定量は、以下の装置・条件で行った。

装置 ; ポンプ ; DS-2 (Shodex)

検出器 ; SPD-6AV UV-VIS spectrophotometer (Shimadzu)

サンプル導入 ; Autosampler Model 23 (SIC) with 20  $\mu$ l sample tube

記録 ; Chromatocoder 12 (SIC)

カラム ; ODSpak F-411 (Shodex), 4.6  $\times$  150mm, 40 °C

分離条件 ; AcCN/H<sub>2</sub>O=50:50, 0.1%TFA, 1ml/min.

活性は乾燥質量 1 g の菌体が 1 時間に 1 l の反応液中に生成するパラシアノ安息香酸の質量 (g/l/h r/g 乾燥菌体) で表すことにした。

## [実施例 9] 高発現株の作製

実施例 4 で得たポジティブクローン P09 株をアンピシリン 50 ppm を含む LB プロスで培養すると、イソプロピルー B-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) の存在の如何に関わらず弱いニトリラーゼ活性が確認できた。しかしこの活性はドナーであるロドコッカス属細菌の数十分の一という低いものであった。他方の P06 株にはニトリラーゼ活性はまったく認められなかった。

そこで酵素生産量を増やすため、酵素構造遺伝子部分のみ、および酵素構造遺伝子とその下流領域約 1.3 kb を含む 2 種の断片を PCR で作製し、pUC18 の lac プロモーター直後につないだプラスミド pUNLE1 および pUNLE2 を作製した。PCR 断片作製に用いたプライマーおよび反応条件は以下の通



り。

pUNLE 1

(フォワード)

5'-aac atg gtc gaa tac aca aac-3'

(リバーズ)

5'-cc aag ctt tca gag ggt ggc tgt-3'

HindIII サイト

pUNLE 2

フォワード -

pUNLE 1と同じ

リバーズ

M13 primer M4

反応液組成:

プラスミドDNA	0.8~1 $\mu$ g
プライマー	各100 pmol
dNTP 溶液	各1 mM
10x 反応バッファー	10 $\mu$ l
ExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製)	2.5 U
	計50 $\mu$ l

反応条件:

熱変性	94°C、60秒
アニーリング	55°C、60秒
伸長	72°C、120秒
サイクル数	24回

生成した断片をアガロースゲル電気泳動し、抽出・回収した。断片を制限酵素 Nco I と Hind III で切断し、EcoRI Nco I リンカーとライゲーション後、EcoRI, Hind III カットした pUC18 とライゲーションした (図2)。

これらのプラスミドで大腸菌 JM109 株を形質転換し、得られた形質転換体

をアンピシリン 50 ppm を含む L プロスで一昼夜培養した後、イソプロビルー B-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を 0.1 mM になるよう培養液に加えてさらに 2 時間培養した。得られた形質転換体のニトリル変換活性を実施例 5 に示した方法により測定したところ、いずれのプラスミドで形質転換した形質転換体も、pUNL09 形質転換体の約 500 倍、およびドナーであるロドコッカス属細菌の約 80 倍のニトリラーゼ活性が確認できた (表 4)。

表 4

株	非誘導時の活性	誘導時の活性
R. sp. ATCC 39484	—	0.14
pUNL09 形質転換体	0.029	0.022
pUNLE1 形質転換体	0.51	11.1
pUNLE2 形質転換体	0.46	10.6

活性単位: g/l/hr/g 乾燥菌体

#### [実施例 10] 高活性株を用いたパラシアノ安息香酸の製造

実施例 9 で得た pUNLE1 形質転換体をアンピシリン 50 ppm を含む L プロスに 2% の寒天を加えて平板化した寒天平板培地で一昼夜培養した菌体一白金耳を、アンピシリン 100 ppm を含む L プロス 100 ml に植菌し、37°C で振とう培養した。この培養液をさらにアンピシリン 100 ppm を含む L プロス 2 l を入れた 5 L ジャーファーマンターに植菌し、37°C、800 rpm、通気 1 ml/min. で一昼夜通気攪拌培養した。定常期初期或いは対数増殖期終期の菌体培養液に、終濃度 0.1 mM になるようイソプロビルー B-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、さらに 4 時間培養を続行した。

培養液を遠心分離して得た菌体を、20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1 l に再懸濁し、100 g のテレフタルニトリル (TPN) を加え、35°C で攪拌しながら反応を行った。反応液の一部を 1 時間毎に取り、実施例 5 の方法により反応液中に生じたパラシアノ安息香酸を定量した。パラシアノ安息香酸は形質転換体により速やかに生成され、約 3 時間で反応液中に 3% 蓄積した (図 3)。反応

終了後、反応液に濃塩酸を添加してpHを1とし、パラシアノ安息香酸を沈殿させた。これを濾紙で濾過し、希塩酸（0.1モル/l）で洗浄した後、真空乾燥した。この乾燥標品の純度は99.9%以上であった。不純物として検出されたのは原料テレフタルニトリルであった。

〔実施例11〕 ニトリルヒドラターゼ遺伝子およびアミダーゼ遺伝子調製用の染色体DNAの調製

栄養（Lプロス）寒天平板培地で一昼夜培養したR. sp. ATCC 39484株一白金耳を基本培地（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/l、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.75 g/l、 $\text{MgSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g/l、 $\text{CaSO}_4/2\text{H}_2\text{O}$  10 mg/l、 $\text{FeSO}_4/7\text{H}_2\text{O}$  5 mg/l、酵母エキス 20 mg/l）にグルコース5 g/l、尿素2 g/lを加えた培地300mlで30℃、1日間培養した。培養後の菌体を集菌し、5mMのEDTA溶液100mlで菌体を洗浄した。この菌体を30mlの緩衝液（20mMトリス・塩酸緩衝液（pH7.1））に懸濁し、60mgのリゾチームを加え37℃で2時間インキュベートした。この懸濁液を遠心（5000rpm, 7分間）して菌体を回収し、11.34mlのTE Bufferに再懸濁し、10%SDS 0.6mlを加え、さらに100μg/mlの濃度となるようにプロテナーゼK（メルク社製）を加え、1時間、55℃でゆるやかに振盪した。この溶液をフェノール抽出、エタノール沈殿することによって染色体DNAを調製した。

〔実施例12〕 染色体ライブラリーの作製

得られた染色体DNA 20μgに対し制限酵素Sau3AIを用いて部分消化を行った。即ち、染色体DNAを4μgずつ5本のチューブにとり、100μlの反応容器中で、制限酵素Sau3AI（宝酒造社製、4~12U/μl）を添加し37℃で反応させ、10秒毎にチューブの一本を取り、終濃度20mMとなるようEDTAを加え反応を停止させた。このようにして調製した染色体DNAの部分消化断片溶液をアガロースゲル電気泳動に供し、5~10kbのDNA断片を沈殿抽出およびエタノール沈殿にて回収し、30μlのTE溶液に溶解させ

た。この試料の  $9\mu\text{l}$  と  $1\mu\text{g}$  の  $\text{BamHI}$  消化後  $\text{BAP}$  処理した  $\text{pUC18}$  (宝酒造社製、 $\text{pUC18/BamHI}$ ) とを  $\text{T4DNA}$  リガーゼ (宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2) を用いて  $20\mu\text{l}$  の量でライゲーションした後、大腸菌  $\text{JM109}$  株を形質転換した。このライブラリーの増幅ライブラリーを作製するために、大腸菌形質転換体をアンピシリン  $50\text{ppm}$  を含む  $\text{L}$  プロス ( $\text{pH}7.0$ ) に植菌し、一昼夜培養した菌体からアルカリ- $\text{SDS}$  法によりプラスミドを抽出した。

### [実施例 13] ニトリルヒドラーゼおよびアミダーゼの精製

アンカー  $\text{PCR}$  に必要な酵素配列に由来する一方のプライマーは、以下のようにして調製した酵素ペプチドの  $\text{N}$  末端配列から、適当な  $\text{Tm}$  を持つように配列を選択して作製した。

ニトリルヒドラーゼ活性またはアミダーゼ活性は、それぞれベンゾニトリル  $10\text{mM}$  またはベンズアミド  $10\text{mM}$ 、リン酸カリウムバッファー ( $\text{pH}7.0$ )  $30\text{mM}$ 、および所定量の菌体抽出液を含む反応混合液  $1\text{ml}$  について、 $25^\circ\text{C}$  で  $30$  分間反応を行わせてから、生成したベンズアミドあるいは安息香酸を  $\text{HPLC}$  により検出することにより定性的に行った ( $\text{HPLC}$  分離条件は後述の実施例 8 と同様)。

$R. \text{ sp. ATCC39484}$  株を実施例 1 の基本培地に誘導基質として  $1\text{g/l}$  のベンゾニトリルを添加したニトリル分解酵素群誘導培地  $600\text{ml}$  に植菌し、 $30^\circ\text{C}$  で振とう培養した。

一昼夜培養した培養液を遠心 ( $8000\text{rpm}$ 、 $15$  分間) に供して菌体を回収し、得られた菌体湿質量  $3.2\text{g}$  を  $100\text{mM}$  リン酸カリウムバッファー ( $\text{pH}7.0$ 、 $1\text{mM}$  の  $\text{EDTA}$  および  $2\text{mM}$  の  $\text{DDT}$  を含む)  $50\text{ml}$  で洗浄した後、同バッファー  $200\text{ml}$  に懸濁した。これを超音波破碎機に供して菌体を破碎した後、遠心分離 ( $12,000\text{rpm}$ 、 $20$  分間) して上清 (粗酵素抽出液)  $180\text{ml}$  を得た。

この無細胞抽出液に  $45\%$  飽和濃度になるよう硫酸アンモニウムを添加し、 $4^\circ\text{C}$  で  $1$  時間攪拌後、生成した沈殿を遠心分離によって除去した。分離した上清に

さらに硫酸アンモニウムを60%飽和濃度になるよう添加し、4℃で1時間攪拌した後、遠心分離により沈殿を回収した。生成した沈殿にはニトリルヒドラーゼ活性およびアミダーゼ活性が確認できた。得られた沈殿を100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0、1mMのEDTAおよび2mMのDDTを含む)10mlに溶解し、同バッファーに対して透析を行なった。

100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0、1mMのEDTAおよび2mMのDDTを含む)で平衡化したDEAE-Sephacelカラム(2cm×20cm)に、透析した粗酵素溶液を供し、平衡化バッファーで溶出液のUV280nmが低下するまで洗浄した。続いて、0.1MKClを添加した同バッファーで溶出液のUV280nmが低下するまで洗浄し、さらに0.2MにKCl濃度を上げたバッファーで同様に溶出液のUV280nmが低下するまで洗浄した。その後、0.3MにKCl濃度を上げた100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0、1mMのEDTAおよび2mMのDDTを含む。)でニトリルヒドラーゼとアミダーゼを溶出した。活性を示すフラクションを集め、限外濾過膜(分子量30,000 cut)を用いて酵素タンパク質を濃縮した。

100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0、10%飽和濃度の硫酸アンモニウムを含む。)で平衡化したPhenyl Sepharose CL-4Bカラム(2cm×40cm)に、濃縮した活性画分に10%飽和濃度の硫酸アンモニウムを添加したものを供し、酵素を吸着させた。平衡化バッファーで溶出液のUV280nmが低下するまで洗浄した。その後、溶出バッファー(100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0))でニトリルヒドラーゼおよびアミダーゼを溶出した。活性フラクションを集め、限外濾過膜(分子量30,000 cut)を用いて酵素タンパク質を濃縮した。

この濃縮したニトリルヒドラーゼ活性画分を100mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0、0.5M NaClを含む)で平衡化したSephacryl S-300 スーパーファインカラム(2cm×60cm)に供し、同バッファーを用いて分離を行い、溶出液を約0.5mlずつフラクションした。この段階で、ニトリルヒドラーゼとアミダーゼ活性が最も高いフラクションが分かれたため、それぞれ最も高い活性およびその前後のフラクションをそれぞれ回

収した。それぞれ約1.5 mlのフラクションを限外濾過膜（分子量30,000 cut）を用いて濃縮した。

#### [実施例14] ペプチド末端配列の決定

得られたニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼのN末端配列の決定を試みたが、いずれの酵素についてもエドマン分解におけるシグナル強度が低く、配列決定ができなかった。そこで酵素タンパク質を臭化シアン（BrCN）法により加水分解し、生成したペプチドを以下の液体クロマトグラフ条件で分離した。

本体；LC 9A（島津製作所）

カラム；Asahipak ODP 50 6D（Shodex）

カラム温度；25℃

溶離液；アセトニトリル0～80%（直線濃度勾配、60分間）、

0.1%トリフルロ酢酸、

流速0.5 ml/分

検出；SPD-6AV UV VIS Spectrophotometer（島津製作所）、

215 nm

ニトリルヒドラターゼ活性画分から得られた複数のペプチドのうち、比較的分離の良いサンプルを選択し、再度エドマン分解によるN末端配列分析を行ったところ、既存のニトリルヒドラターゼの配列と相同性の高い以下の配列が確認できた。

Glu (E) · Tyr (Y) · Arg (R) · Ser (S) · Arg (R) · Val (V) · Val (V)

この配列とRhodococcus属細菌のCodon Usageを考慮して、ニトリルヒドラターゼ用プライマーを作製した。

5' -GAG TAC CGG TCC CGA-3'（およびその相補鎖）

同様に、アミダーゼ活性画分から得られた複数のペプチドのうち、比較的分離の良いサンプルを選択し、エドマン分解によるN末端配列分析を行ったところ、

既存のアミダーゼの配列と相同性の高い以下の配列が確認できた。

Ala (A) · Val (V) · Gly (G) · Gly (G) · Asp (D) · Gln (Q) · Gly (G)

この配列とロドコッカス属細菌の Codon Usage を考慮して、アミダーゼ用プライマーを作製した。

5' - GCA GTC GGC GGC GAC - 3' (およびその相補鎖)

#### [実施例 15] アンカー PCR

PCR 法は以下の反応条件で行った。

反応液組成：

R. sp. ATCC 39484 染色体 DNA ライブラリー	1 $\mu$ g
ユニバーサルプライマー	100 pmol
酵素ヘプチド末端プライマー	100 pmol
dNTP 溶液	各 1 mM
10x 反応バッファー	10 $\mu$ l
ExTaq DNA ポリメラーゼ (宝酒造社製)	2.5 Unit
	計 50 $\mu$ l

反応条件：

熱変性	94°C、45 秒
アニーリング	37~60°C、60 秒
伸張	72°C、60~90 秒
サイクル数	24 回

このようにして行った反応のうち、特異的に増幅される断片が見られた反応液を 2% アガロースゲル電気泳動に供し、断片を含む部分のゲルを切り出し、EAS YTRAP ver. 2 (宝酒造社製) を用いて精製した。この DNA 断片について、dideoxy 法により DNA 配列を決定し、翻訳されたアミノ酸配列が既知のニトリルヒドラーゼまたはアミダーゼと相同性があることを確認した。その結果、得られた断片 4、14 中に、それぞれ既知のニトリルヒドラーゼ

ぜ、アミダーゼと相同性の高い配列が含まれていることが分かった。断片4には約500bpのニトリルヒドラターゼ相同配列が、断片14には約900bpのアミダーゼ相同配列が含まれており、いずれも次のコロニーハイブリダイゼーションに用いるプローブとして十分な長さであった。

#### [実施例16] コロニーハイブリダイゼーション

実施例15で得られたニトリルヒドラターゼ遺伝子の一部、およびアミダーゼ遺伝子の一部を含むPCR断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション法により全遺伝子のクローニングを行った。実施例2の方法に従ってSau3AIで分解した染色体DNAの部分消化断片溶液を1%のアガロースゲル電気泳動に供し、4~8kbのDNA断片を泳動抽出およびエタノール沈殿にて回収し、乾燥後30 $\mu$ lのTE溶液に溶解した。この試料溶液の9 $\mu$ lと、1 $\mu$ lのBamHI消化後BAP処理したpUC18（宝酒造社製、100ng）とをT4DNAリガーゼ（宝酒造社製、ライゲーションキット ver. 2）を用いてライゲーションした後、大腸菌JM101株を形質転換し、イソプロピルーB-D-チオガラクトピラノシド（IPTG）0.1mM、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルー $\beta$ -D-ガラクトピラノシド（X-gal）0.004%、アンピシリン50ppmを含むLプロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に塗布して37 $^{\circ}$ Cで一昼夜培養した。

生じた白色コロニーを、アンピシリン50ppmを含むLプロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に釣菌し、37 $^{\circ}$ Cで一昼夜培養した。十分生育した後、寒天平板培地を約2時間4 $^{\circ}$ Cに置き冷却した。

乾いたナイロンメンブレン（アマシャム ファルマシア バイオテック社製、Hybond-N<sup>+</sup>）に上下左右の印を鉛筆で付けた後冷却した平板培地の上に静かに置き、メンブレンが全体に濡れてくるのを待って静かにかつ一気にはがし、平板上のコロニーをメンブレンに移し取った。移し取った菌体が少ない時は、メンブレンをアンピシリン50ppmを含むLプロスに2%の寒天を加えて平板化した寒天平板培地に置き、37 $^{\circ}$ Cで一昼夜培養した。

菌体を移したメンブレンを3mlのアルカリ溶液（NaOH 0.5M）上に浮



かせ、菌体を溶解した。溶解した菌体の残査を、 $5 \times \text{SSC}$ で20分間 $\times 2$ 回洗浄して落とした。このメンブレンに対し、Random prime DNA labelling and detection system (アマシャム : ファルマシア バイオテク社製) を用いてコロニーハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション検出の手順は、同キット添付のマニュアルに従って標準的な条件で行った。約8000コロニーに対して行ったハイブリダイゼーションの結果、各遺伝子について各1株のポジティブクローンが得られた。

これらのポジティブクローンからアルカリ-SDS法によりプラスミドを抽出し、プローブ用部分断片中にある制限酵素切断サイトの位置と、プラスミドの制限酵素分解パターンとを比較して、挿入断片中の遺伝子の位置と方向を推定した。その結果、ニトリルヒドラターゼのクローン株P11から調製したプラスミドpUNH11は全ニトリルヒドラターゼ遺伝子を含んでいることが分かったが(図4)、アミダーゼのクローン株P12から調製したプラスミドpUAMD12は制限酵素処理パターンが複雑であり、遺伝子の位置方向を特定することができなかった。そこでpUAMD12に関してのみさらに制限酵素処理したフラグメントに対するサザンハイブリダイゼーションを行い、全構造遺伝子領域を含んでいることを推定した(図4)。

#### [実施例17] ; 欠損変異株の作製と塩基配列の決定

pUNH11およびpUAMD12はそれぞれ3kb $\sim$ 4kbの挿入断片を含むプラスミドであり、そのままでは塩基配列の決定が困難であった。そこでExonuclease III を用いて末端から挿入断片を欠損させた欠損変異体(deletion mutant)の作製を試みた。変異体の作製にはkilo-sequence用Deletion Kit (宝酒造社製) を用いた。すなわち、pUNH11またはpUAMD12溶液25マイクロリットル(0.4mg/mlとして約16マイクログラム)をSse8387I、XbaIで完全分解(37 $^{\circ}\text{C}$ 、24時間)し、フェノール抽出で精製後、1/10容量の3M酢酸Naと2.5容量のエタノールを加えて沈殿させた。遠心して沈殿を回収し、70%冷エタノールで一回洗浄した後、真空乾燥沈殿を100マイクロリットルのE

x o III bufferに溶解した。DNA溶液に1マイクロリットルのExo nuclease IIIを加え、ボルテックスで攪拌後、37℃でインキュベートし、10秒および30秒後に各50マイクロリットルをサンプリングした（反応を停止するため、用意してあったMB nuclease buffer各50マイクロリットルと混合）。

この反応液にMB nuclease 2マイクロリットルを添加し、37℃で20分間インキュベートした。反応終了後、フェノール抽出して精製し、1/10容量の3M酢酸Naと2.5容量のエタノールを加えて沈殿させた。遠心して回収し、70%冷エタノールで一回洗浄した後真空乾燥させた沈殿を50マイクロリットルのklenow bufferに溶解し、klenow fragment 1マイクロリットルを加え37℃で15分間インキュベートした。この反応液をアガロースゲル電気泳動に供し、3つの鎖長域に分画した（ゲルよりそれぞれ切り出し、抽出回収。）。

切り出した断片の回収液10マイクロリットルを100マイクロリットルのligation solution Aと混合し、ligation solution B 12マイクロリットルを加え、ボルテックスで攪拌後16℃で24時間反応させ、セルフライゲーションさせた。このプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換した。

この操作により、pUNH11については20種以上の欠損変異体が取得でき、この中から適当な長さの挿入断片を含む変異体7種を選択し、配列決定に用いることにした。しかし、pUAMD12に関しては、もとのプラスミドより大きなプラスミドや用いたベクターより小さなプラスミドが生成するなど、適当な欠損体が取得できないことが判った。そこでpUAMD12に関しては逐次プライマーを合成しながら配列を決定するgene walking法による配列決定を行うことにした。

塩基配列の決定はdideoxy法により、pUNH11は挿入断片の全域に相当する約2.8kbのDNA配列、pUAMD12は挿入断片の約2/3に相当する約2.8kbのDNA配列を決定した。プローブとして用いた部分断片配列と一致する部分を探索したところ、pUNH11、pUAMD12それぞれの

挿入断片のEcoRIサイト側から約0.2 kb、1.1 kb下流から、ニトリルヒドラターゼ遺伝子はlacプロモーターに対して逆順に、アミダーゼ遺伝子は正の方向に存在していることが分かった。それぞれの塩基配列の解析結果を配列番号3および6に示す。この方向と位置は、pUNH11に関しては制限酵素の切断断片生成パターンから推定した遺伝子の位置と方向に、pUAMD12に関しては制限酵素の切断パターンとサザンハイブリダイゼーションの結果から推定されたものと一致していた。これらの遺伝子配列から翻訳されたアミノ酸配列（配列番号4、5および7）は、既知のいずれのニトリルヒドラターゼ、アミダーゼのアミノ酸配列とも異なる新規なものであった。

【実施例18】 ニトリルヒドラターゼおよびアミダーゼ活性の測定

ニトリルヒドラターゼ活性は20 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）10 mlにテレフタルニトリル（TPN）を基質として1～10質量%を懸濁した反応液に、菌体（湿質量で1 g前後）を加えて30℃で振とうしながら反応を行い、一定時間毎に反応液中に生成したパラシアノ安息香酸アミドをHPLCで定量することによって測定した。通常、反応液から固形物を遠心分離して除去した後、上清を溶離液で100倍希釈したものをHPLCサンプルとして用いた。アミダーゼ活性は基質としてパラシアノベンズアミドまたはベンズアミドを用い、同じ条件で反応させ、生成したパラシアノ安息香酸または安息香酸をHPLCで定量することによって測定した。

各生成物の定量は、以下の装置・条件で行った。

装置： ポンプ；DS-2（Shodex）

検出器；SPD-6AV UV-VIS spectrophotometer（Shimadzu）

サンプル導入；Autosampler Model23（SIC） with 20  $\mu$ l sample tube

記録；Chromatocoder 12（SIC）

カラム；ODSpak F-411（Shodex），4.6  $\times$  150mm、40℃

分離条件；AcCN/H<sub>2</sub>O=50:50, 0.1%TFA, 1ml/min.

活性は乾燥質量1 gの菌体が1時間に1 lの反応液中に生成するパラシアノ安息香酸アミド、パラシアノ安息香酸または安息香酸のg質量（g/l/h r/g乾燥

菌体)で表すことにした。

#### [実施例19] 高発現株の作製

実施例16で得たポジティブクローンP11またはP12株をアンピシリン50ppmを含むLBプロスで培養すると、イソプロピルーB-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)の存在の如何に関わらず弱いニトリルヒドラターゼ活性が確認できた。しかしこの活性はドナーであるロドコッカス属細菌の数十分の一という低いものであった。他方のP12株にはアミダーゼ活性はまったく認められなかった。

そこで酵素生産量を増やすため、それぞれの酵素構造遺伝子部分のみの断片をPCRで作製し、pUC18のlacプロモーター直後につないだプラスミドpUNHE1およびpUAMDE1を作製した。さらにこの両断片を同じプラスミド上に乗せたプラスミドpUNHAMDE1を作製した。

PCR断片作製に用いたプライマーおよび反応条件は以下の通り。

pUNHE1

(フォワード)

5'-acc atg gat ggt atc cac gac-3'

(βサブユニット開始コドン)(NcoIサイト)

(リバーズ)

5'-cc aag ctt tca tac gat cac ttc-3'

(αサブユニット終止コドン)(HindIIIサイト)

pUAMDE1

(フォワード)

5'-acc atg gct tcg ttg act cc-3'

(NcoIサイト、アミノ酸3番目Ser→Alaに変異)

(リバーズ)

5'-cc aag ctt tca gga cgg cac cga-3'

(HindIIIサイト)

反応液組成:

プラスミドDNA	0.8~1 $\mu$ g
プライマー	各100 pmol
dNTP溶液	各1 mM
10x反応バッファー	10 $\mu$ l
ExTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造社製)	2.5 U
	計50 $\mu$ l

反応条件:

熱変性	94°C、60秒
アニーリング	55°C、60秒
伸長	72°C、120秒
サイクル数	24回

ニトリルヒドラターゼ遺伝子、アミダーゼ遺伝子共に、生成した断片をアガロースゲル電気泳動し、抽出・回収した後、断片を制限酵素NcoIとHindIIIで切断し、EcoRI-NcoIリンカーとライゲーション後、EcoRI-HindIIIカットしたpUC18とライゲーションした(図5)。

ニトリルヒドラターゼ遺伝子とアミダーゼ遺伝子を同じプラスミド上に乗せたプラスミドは、まずニトリルヒドラターゼ断片を制限酵素NcoIとHindIIIで切断し、EcoRI-NcoIリンカー、HindIII-NcoIリンカーの順でライゲーション後、NcoIとHindIIIで切断したアミダーゼ断片とライゲーションし、最後にEcoRI-HindIIIカットしたpUC18とこの断片をライゲーションした(図6)。

これらのプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換し、得られた形質転換体をアンピシリン50 ppmを含むLプロスで一昼夜培養した後、イソプロピルーB-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を0.1 mMになるよう培養液に加えてさらに2時間培養した。得られた形質転換体のニトリル変換活性を実施例8に示した方法により測定したところ、いずれのプラスミドで形質転換した形質転換体も、ドナーであるロドコッカス属細菌より高い活性が確認できた。両方の遺伝子を乗せたプラスミドで形質転換したもののみは、ドナーと同等の活性を示した。結果を次の表5に要約した。

表 5

株	非誘導時の活性	誘導時の活性
R. sp. ATCC 39484	—	0.17 <sup>1)</sup>
pUNH11形質転換体	0.009	0.007
pUAMD12形質転換体	n.d.	n.d.
pUNHE1形質転換体	0.35	0.41
pUAMDE1形質転換体	0.11	0.27
pUNHAMDE1形質転換体	0.11 <sup>2)</sup>	0.13 <sup>2)</sup>

活性単位：g/l/hr/g乾燥菌体

<sup>1)</sup> ドナーの活性はアミドの生成速度のみ（酸の生成速度はニトリラ  
ーゼの影響のため正確に測定不能）

<sup>2)</sup> pUNHAMDE1はニトリル→酸生成速度を測定

#### 寄託の開示

以下の微生物は、通産省工業技術院生命工学工業技術研究所（日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号）に寄託されている：

微生物	受託番号	寄託日
ロドコッカス sp. SD826	FERM BP-7305	1999年10月12日

この寄託微生物は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約の規定およびそれに基づく規則のもとで行われた。

## 請求の範囲

1. ニトリル化合物の少なくとも1つのシアノ基を、微生物を用いてカルボキシル基に変換してカルボン酸類を製造する方法において、シアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または低減した変異微生物を用いてニトリル化合物をカルボン酸類に変換することを含むことを特徴とするカルボン酸類の製法。
2. 上記変異微生物がロドコッカス属細菌の変異株である請求項1に記載のカルボン酸類の製法。
3. 上記ロドコッカス属細菌の変異株がロドコッカス sp. (Rhodococcus sp.) ATCC 39484を親株とする変異株である請求項2に記載のカルボン酸類の製法。
4. ロドコッカス sp. (Rhodococcus sp.) ATCC 39484を親株とする変異株がロドコッカス sp. SD 826 (FERM BP-7305)である請求項3に記載のカルボン酸類の製法。
5. ニトリル化合物が分子内に複数のシアノ基を有するポリニトリル化合物であり、カルボン酸類がシアノカルボン酸類である請求項1乃至4のいずれかに記載のカルボン酸類の製法。
6. ポリニトリル化合物が芳香族ポリニトリル化合物であり、シアノカルボン酸類が芳香族シアノカルボン酸類である請求項5に記載のカルボン酸類の製法。
7. 芳香族ポリニトリル化合物がオルトフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、芳香族シアノカルボン酸類がオルトシアノ安息香酸、メタシアノ安息香酸またはパラシアノ安息香酸である請求項6に記載のカルボン酸類の製法。
8. シアノ基をカルボキシル基に変換する能力を有し、かつシアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または低減した変異微生物。
9. 変異微生物がロドコッカス属細菌の変異株である請求項8に記載の変異微生物。
10. 変異微生物がロドコッカス sp. (Rhodococcus sp.) ATCC 39484の変異株である請求項9に記載の変異微生物。

11. ロドコッカス sp. SD826 (FERM BP-7305) 株。
12. 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法。
13. 配列表の配列番号1で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法。
14. 請求項12または13に記載の形質転換体を用いてポリニトリル化合物の少なくとも1つをカルボキシル基に変換することを含むシアノカルボン酸類の製法。
15. ポリニトリル化合物が芳香族ポリニトリル化合物である請求項14に記載のシアノカルボン酸類の製法。
16. 芳香族ポリニトリル化合物がオルトフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、シアノカルボン酸類がオルト、メタまたはパラシアノ安息香酸である請求項15に記載のシアノカルボン酸類の製法。
17. 請求項12乃至16のいずれか1項に記載の方法において用いられる、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体。
18. 請求項12乃至16のいずれか1項に記載の方法において用いられる、配列表の配列番号1で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体。
19. 請求項17に記載の形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子を含むプラスミド。
20. 請求項18に記載の形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号1で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子



を含むプラスミド。

21. 配列表の配列番号2で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。
22. 配列表の配列番号1で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子。
23. ロドコッカス属細菌が、ロドコッカス *sp.* (Rhodococcus *sp.*) ATCC 39484株である請求項22に記載のニトリラーゼ遺伝子。
24. 請求項17または18に記載の形質転換体を培養し、培養物からニトリラーゼを採取することを含むニトリラーゼの製法。
25. 請求項24記載の方法で作製されたニトリラーゼ。
26. 配列表の配列番号4および5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をアミド基に変換することを含むアミド類の製法。
27. 配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をアミド基に変換することを含むアミド類の製法。
28. 配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、アミド類のアミド基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法。
29. 配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、アミド類のアミド基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法。
30. 配列表の配列番号4および/または5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配

列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法。

31. 配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体を用いて、ニトリル化合物のシアノ基をカルボキシル基に変換することを含むカルボン酸類の製法。

32. ニトリル類が、オルトフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、アミド類がオルトシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミド、パラシアノベンズアミドである請求項26または27に記載のアミド類の製法。

33. アミド類が、オルトシアノベンズアミド、メタシアノベンズアミド、パラシアノベンズアミドであり、カルボン酸類がオルト、メタまたはパラシアノ安息香酸である請求項28または29に記載のカルボン酸類の製法。

34. ニトリル類が、オルトフタロニトリル、イソフタロニトリルまたはテレフタロニトリルであり、カルボン酸類がオルト、メタまたはパラシアノ安息香酸である請求項30または31に記載のカルボン酸類の製法。

35. 請求項26に記載の方法に用いられる、配列表の配列番号4および5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体。

36. 請求項27に記載の方法に用いられる、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラターゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体。

37. 請求項28に記載の方法に用いられる、配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体。

38. 請求項29に記載の方法に用いられる、配列表の配列番号6で示される

DNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体。

39. 請求項30に記載の方法に用いられる、配列表の配列番号4および/または5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体。

40. 請求項31に記載の方法に用いられる、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミドにより形質転換された形質転換体。

41. 請求項35に記載の形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号4および5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子を含むプラスミド。

42. 請求項36に記載の形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子を含むプラスミド。

43. 請求項37に記載の形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミド。

44. 請求項38に記載の形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子を含むプラスミド。

45. 請求項39に記載の形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号4および5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミド。

46. 請求項40に記載の形質転換体の調製に用いられる、配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子、ならびに配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子の両方を含むプラスミド。

47. 配列表の配列番号4および/または5で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子。

48. 配列表の配列番号3で示されるDNA配列からなる、ロドコッカス属細菌由来のニトリルヒドラーゼ遺伝子。

49. ロドコッカス属細菌が、ロドコッカス sp. (Rhodococcus sp.) ATCC 39484株である請求項47に記載のニトリルヒドラーゼ遺伝子。

50. 配列表の配列番号7で示されるアミノ酸配列をコードするDNA配列からなるロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子。

51. 配列表の配列番号6で示されるDNA配列からなる、ロドコッカス属細菌由来のアミダーゼ遺伝子。

52. ロドコッカス属細菌が、ロドコッカス sp. (Rhodococcus sp.) ATCC 39484株である請求項51に記載のアミダーゼ遺伝子。

53. 請求項35または36に記載の形質転換体を培養し、培養物からニトリルヒドラーゼを採取することを含むニトリルヒドラーゼの製法。

54. 請求項37または38に記載の形質転換体を培養し、培養物からアミダーゼを採取することを含むアミダーゼの製法。

55. 請求項39または40に記載の形質転換体を培養し、培養物からニトリルヒドラーゼおよび/またはアミダーゼを採取することを含むニトリルヒドラーゼおよび/またはアミダーゼの製法。

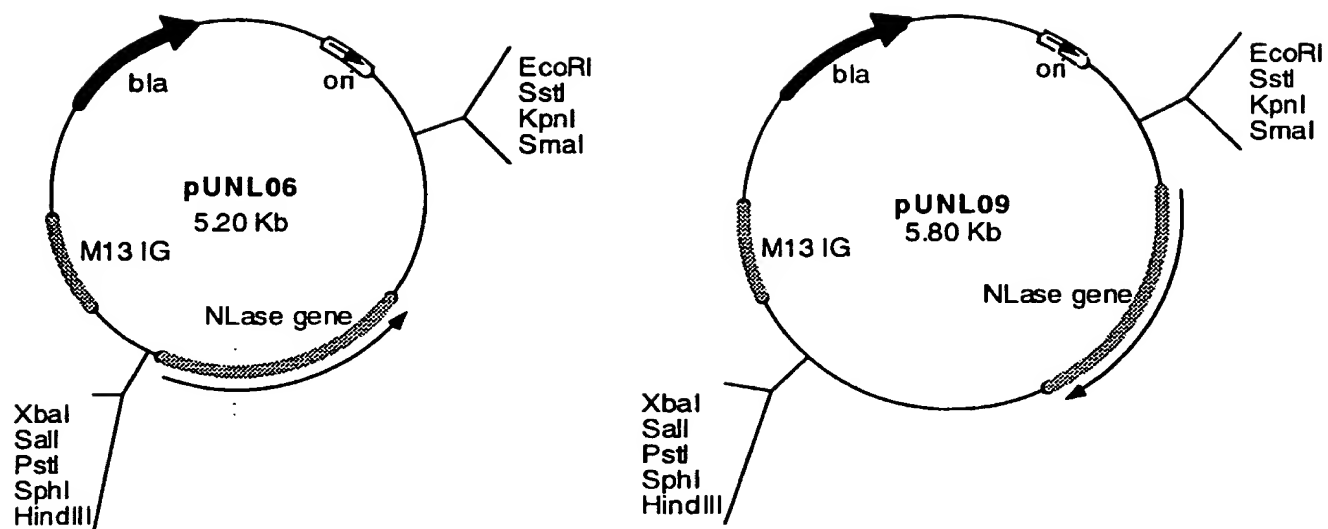
56. 請求項53に記載の製法で作製されたニトリルヒドラーゼ。

57. 請求項54に記載の製法で作製されたアミダーゼ。

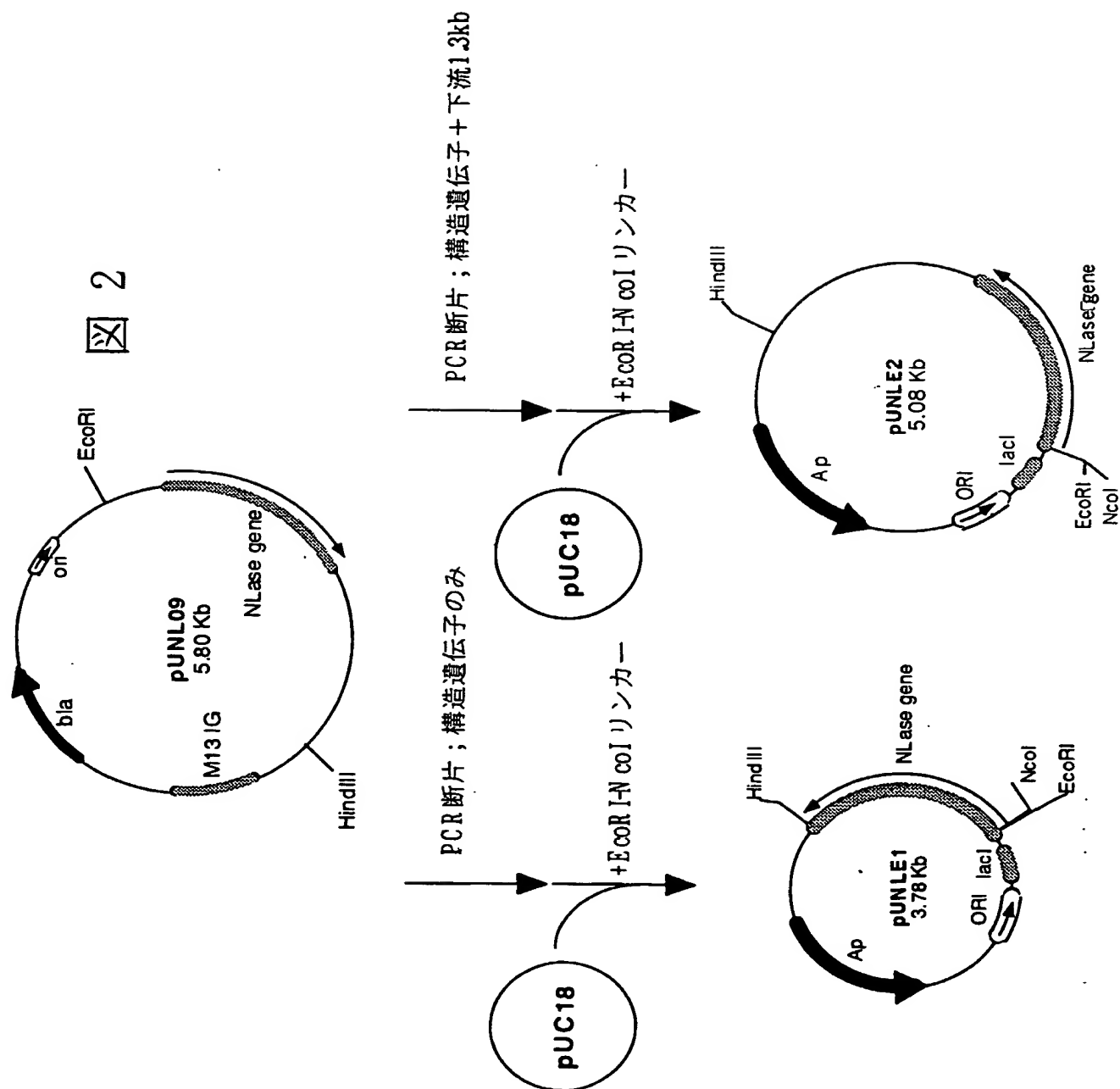
58. 請求項55に記載の製法で作製されたニトリルヒドラーゼおよび/またはアミダーゼ。

1/5

1











3/5

図 3

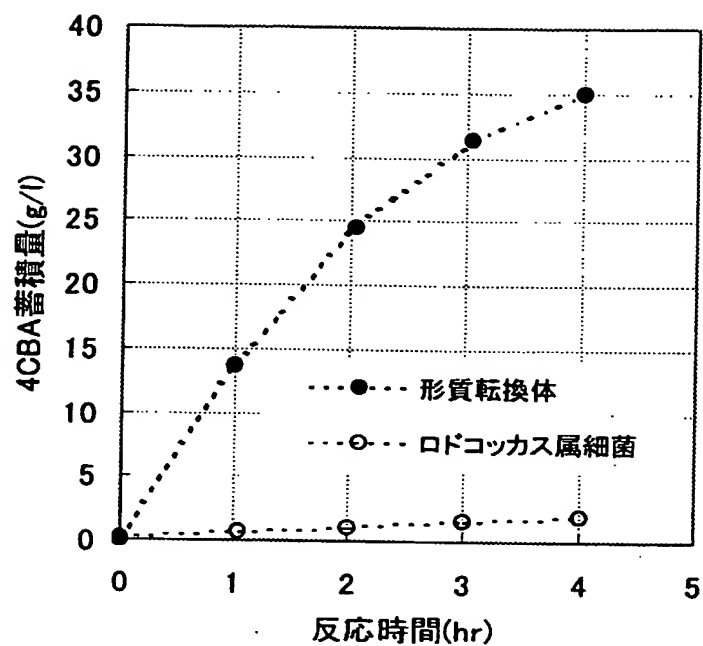


図 4

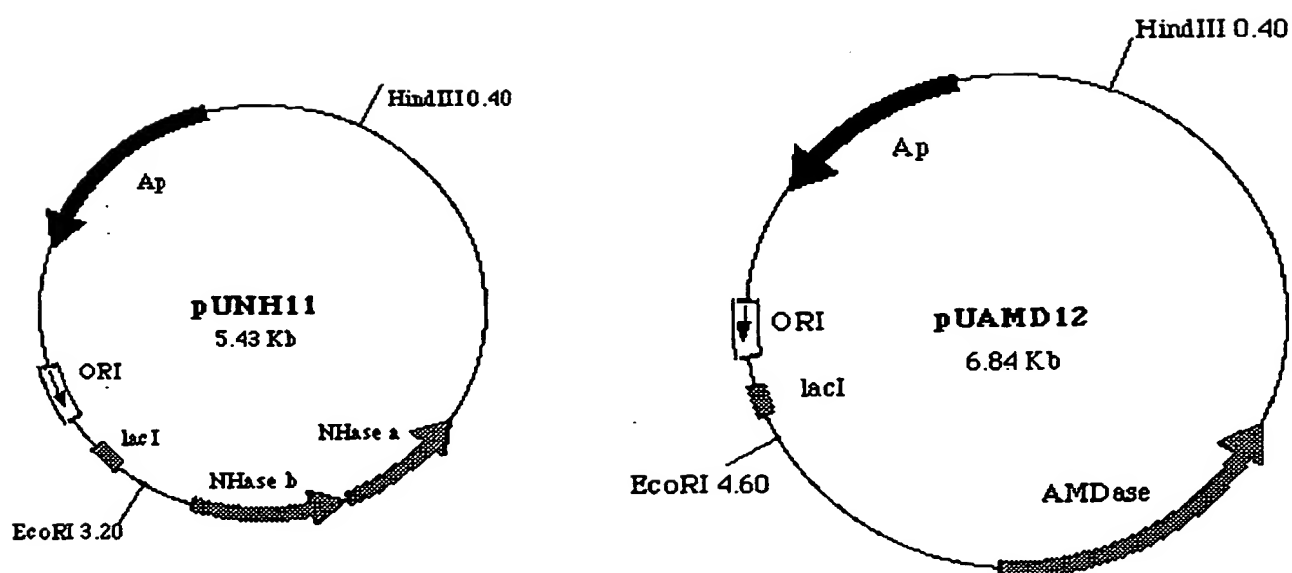
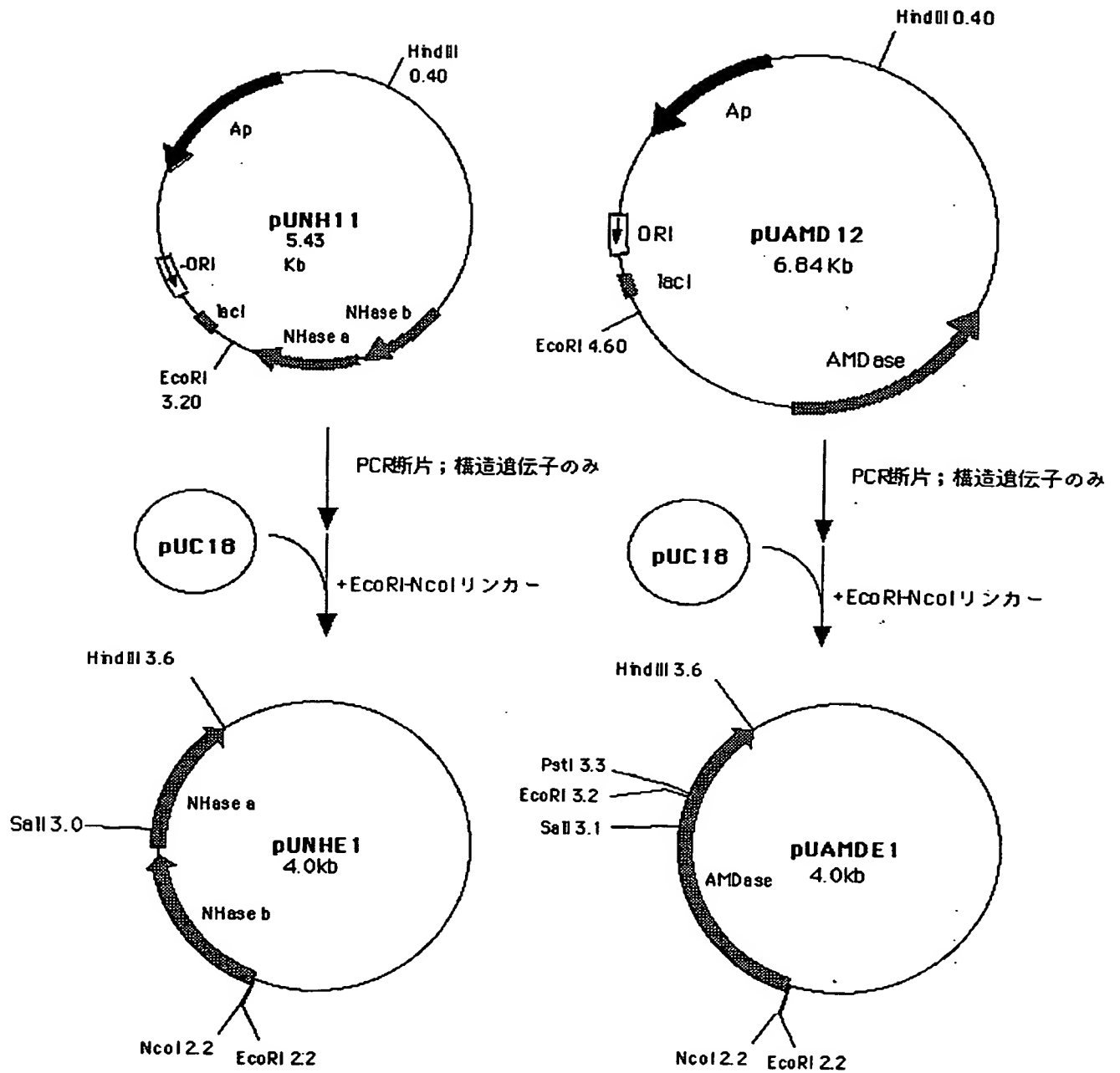


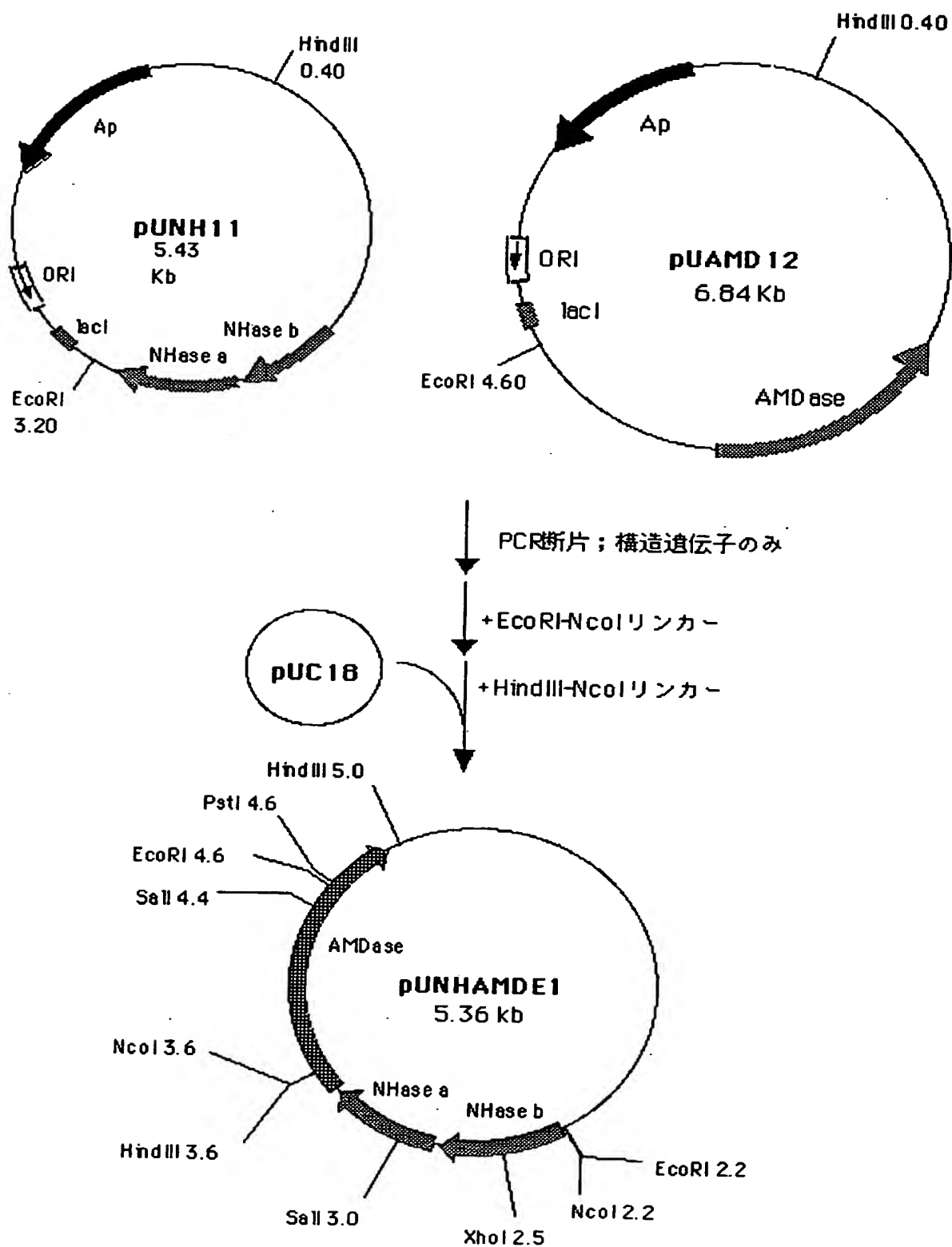


図 5





## 図 6





## SEQUENCE LISTING

<110> SHOWA DENKO K. K.

<120> A Novel Rhodococcus Bacteria, Nitrilase Gene, Nitrile Hydratase Gene  
and Amidase Gene from Rhodococcus Bacteria, and Process for Producing  
Carboxylic Acids by the Same.

<130> PC-8404

<150> JP 11-303212

<151> 1999-10-26

<160> 7

<210> 1

<211> 1531

<212> DNA

<213> Rhodococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (324)..(1421)

<400> 1

agcttgacca tgattacgaa ttcgagctcg gtacccgggg atcgaaccag caacggggac 60

gcacagtga cgtagacctc gacctatccg ccgttcgca gaaggacacc gaccaccacc 120

acttcaacat ccttcaacgt gcccgccag tccttcgacg aatcgaaacg gogaagagcc 180

gcctcggacc ccccgccga accgctcgat gaactccct acacgggtgg cgcagaatgc 240

caggaccctg gtcattccac gtcaattcac ggccttttc acctgtact gtctgcca 300

acacaagcaa cggaggtacg gac atg gtc gaa tac aca aac aca ttc aaa gtt 353





Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val

1

5

10

gct gcg gtg cag gca cag cct gtg tgg ttc gac gcg gcc aaa acg gtc 401

Ala Ala Val Gln Ala Gln Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val

15

20

25

gac aag acc gtg tcc atc atc gcg gaa gca gcc cgg aac ggg tgc gag 449

Asp Lys Thr Val Ser Ile Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu

30

35

40

ctc gtt gcg ttt ccc gag gta ttc atc ccg ggg tac ccg tac cac atc 497

Leu Val Ala Phe Pro Glu Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile

45

50

55

tgg gtc gac agc ccg ctc gcc gga atg gcg aag ttc gcc gtg cgc tac 545

Trp Val Asp Ser Pro Leu Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr

60

65

70

cac gag aat tcc ctg acg atg gac agc ccg cac gta cag cgg ttg ctc 593

His Glu Asn Ser Leu Thr Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu

75

80

85

90

gat gcc gcc cgc gac cac aac atc gcc gta gtg gtg gga atc agc gag 641

Asp Ala Ala Arg Asp His Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu

95

100

105

cgg gat ggc ggc agc ttg tac atg acc cag ctc atc atc gac gcc gat 689

Arg Asp Gly Gly Ser Leu Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp Ala Asp

110

115

120

ggg caa ctg gtc gcc cga cgc cgc aag ctc aag ccc acc cac gtc gag 737

Gly Gln Leu Val Ala Arg Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu

125

130

135



cgt tcg gta tac gga gaa gga aac ggc tcg gat atc tcc gtg tac gac 785  
Arg Ser Val Tyr Gly Glu Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp  
140 145 150

atg cct ttc gca cgg ctt ggc gcg ctc aac tgc tgg gag cat ttc cag 833  
Met Pro Phe Ala Arg Leu Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln  
155 160 165 170

acg ctc acc aag tac gca atg tac tcg atg cac gag cag gtg cac gtc 881  
Thr Leu Thr Lys Tyr Ala Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val  
175 180 185

gcg agc tgg cct ggc atg tcg ctg tac cag ccg gag gtc ccc gca ttc 929  
Ala Ser Trp Pro Gly Met Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe  
190 195 200

ggc gtc gat gcc cag ctc acg gcc acg cgt atg tac gca ctc gag gga 977  
Gly Val Asp Ala Gln Leu Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly  
205 210 215

caa acc ttc gtg gtc tgc acc acc cag gtg gtc aca ccg gag gcc cac 1025  
Gln Thr Phe Val Val Cys Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His  
220 225 230

gag ttc ttc tgc gag aac gag gaa cag cga atg ttg atc ggc cga ggc 1073  
Glu Phe Phe Cys Glu Asn Glu Glu Gln Arg Met Leu Ile Gly Arg Gly  
235 240 245 250

gga ggt ttc gcg cgc atc atc ggg ccc gac ggc cgc gat ctc gca act 1121  
Gly Gly Phe Ala Arg Ile Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr  
255 260 265

cct ctc gcc gaa gat gag gag ggg atc ctc tac gcc gac atc gat ctg 1169  
Pro Leu Ala Glu Asp Glu Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu  
270 275 280



tct gcg atc acc ttg gcg aag cag gcc gct gac ccc gtg ggc cac tac 1217  
Ser Ala Ile Thr Leu Ala Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr  
285 290 295

tca cgg ccg gat gtg ctg tcg ctg aac ttc aac cag cgc cgc acc acg 1265  
Ser Arg Pro Asp Val Leu Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg Arg Thr Thr  
300 305 310

ccc gtc aac acc cca ctt tcc acc atc cat gcc acg cac acg ttc gtg 1313  
Pro Val Asn Thr Pro Leu Ser Thr Ile His Ala Thr His Thr Phe Val  
315 320 325 330

ccg cag ttc ggg gca ctc gac ggc gtc cgt gag ctc aac gga gcg gac 1361  
Pro Gln Phe Gly Ala Leu Asp Gly Val Arg Glu Leu Asn Gly Ala Asp  
335 340 345

gaa cag cgc gca ttg ccc tcc aca cat tcc gac gag acg gac cgg gcg 1409  
Glu Gln Arg Ala Leu Pro Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp Arg Ala  
350 355 360

aca gcc acc ctc tgactcgggc gcaccctgtg cgcctccgaa gcgccacggg 1461  
Thr Ala Thr Leu  
365

tgtgtgaagg ggcgagacag gggaatcgga ggatccccgg gtaccgagct cgaattcgta 1521

atcatggtca 1531

<210> 2

<211> 366

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

<400> 2

Met Val Glu Tyr Thr Asn Thr Phe Lys Val Ala Ala Val Gln Ala Gln



1	5	10	15
Pro Val Trp Phe Asp Ala Ala Lys Thr Val Asp Lys Thr Val Ser Ile			
20	25	30	
Ile Ala Glu Ala Ala Arg Asn Gly Cys Glu Leu Val Ala Phe Pro Glu			
35	40	45	
Val Phe Ile Pro Gly Tyr Pro Tyr His Ile Trp Val Asp Ser Pro Leu			
50	55	60	
Ala Gly Met Ala Lys Phe Ala Val Arg Tyr His Glu Asn Ser Leu Thr			
65	70	75	80
Met Asp Ser Pro His Val Gln Arg Leu Leu Asp Ala Ala Arg Asp His			
85	90	95	
Asn Ile Ala Val Val Val Gly Ile Ser Glu Arg Asp Gly Gly Ser Leu			
100	105	110	
Tyr Met Thr Gln Leu Ile Ile Asp Ala Asp Gly Gln Leu Val Ala Arg			
115	120	125	
Arg Arg Lys Leu Lys Pro Thr His Val Glu Arg Ser Val Tyr Gly Glu			
130	135	140	
Gly Asn Gly Ser Asp Ile Ser Val Tyr Asp Met Pro Phe Ala Arg Leu			
145	150	155	160
Gly Ala Leu Asn Cys Trp Glu His Phe Gln Thr Leu Thr Lys Tyr Ala			
165	170	175	
Met Tyr Ser Met His Glu Gln Val His Val Ala Ser Trp Pro Gly Met			
180	185	190	
Ser Leu Tyr Gln Pro Glu Val Pro Ala Phe Gly Val Asp Ala Gln Leu			





195                      200                      205

Thr Ala Thr Arg Met Tyr Ala Leu Glu Gly Gln Thr Phe Val Val Cys  
210                      215                      220

Thr Thr Gln Val Val Thr Pro Glu Ala His Glu Phe Phe Cys Glu Asn  
225                      230                      235                      240

Glu Glu Gln Arg Met Leu Ile Gly Arg Gly Gly Gly Phe Ala Arg Ile  
245                      250                      255

Ile Gly Pro Asp Gly Arg Asp Leu Ala Thr Pro Leu Ala Glu Asp Glu  
260                      265                      270

Glu Gly Ile Leu Tyr Ala Asp Ile Asp Leu Ser Ala Ile Thr Leu Ala  
275                      280                      285

Lys Gln Ala Ala Asp Pro Val Gly His Tyr Ser Arg Pro Asp Val Leu  
290                      295                      300

Ser Leu Asn Phe Asn Gln Arg Arg Thr Thr Pro Val Asn Thr Pro Leu  
305                      310                      315                      320

Ser Thr Ile His Ala Thr His Thr Phe Val Pro Gln Phe Gly Ala Leu  
325                      330                      335

Asp Gly Val Arg Glu Leu Asn Gly Ala Asp Glu Gln Arg Ala Leu Pro  
340                      345                      350

Ser Thr His Ser Asp Glu Thr Asp Arg Ala Thr Ala Thr Leu  
355                      360                      365

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2822

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rhodococcus sp.



<220>

<221> CDS

<222> (1379).. (2068)

<223> nitrile hydratase beta subunit

<220>

<221> CDS

<222> (2082).. (2693)

<223> nitrile hydratase alpha subunit

<400> 3

ctagaggatc tgggtcatcg cgataccatc gttgcggacg atgatgtcca atacgtacca 60

ctgggtccgcg gtcaacttct ctgtgatcgac cacgttatgg attctacgac tcagggaccg 120

gctcacggct tccagggcgc ctccgaccaa aggtgatcga acgacatttc cggattcagc 180

caccgcttcc gactcgatca ttctgtccc tccccgtcca cgcgcagttg atcttacctc 240

ctcatcaaga ggatatccac tgaacgaatt attcaagtg gaagtacttg gagtcgatcc 300

tacacgtgag tggacgatgc ctgggcgcta gtcggatgtg caaccacccc accccctcct 360

cccgctacg ccgaagaccg gaaccggcgt cgtccctgcc tgccgtctct ggcaactgtt 420

gtgaacgccc gagcggccct cacggctctt cagttggcgc ggatcgccat ggcggacgtc 480

gcccacggcg ggacctacgc atcttcggcc ggaaggcagc cgcggtcacg aacacctagc 540

ggcagtcgag cactgagac gaaggccgcc ggcgtcctgt cccggaaatc cgcagcccag 600

ccgtgacagc caacagtcgt ggcggttccc tcccctcta gggctcttga ctcggcgcca 660

acgcctgcga gggcgctcgt cgcggaccac ttgtcagagt cggtgccgca cgtcaccgag 720



cgcacccttc ttctgtctct gcgcacggc ccggaccgag accgcggcaa cactacgag 780  
tctgacaatg ctgatccct gccgcgcgcg ttggacgacc acagttgcta cgagcatgcg 840  
gagccaacca taggcatcat gcgatcgccg gagtcttcat cctattttgg gatgcgcagg 900  
attaacacat ctacacattg acatccgttc cgatgtgaag taaaaattgt cacgtagggc 960  
ggcaggcgaa gtctgcagct cgaacatcga aggggtgggag ccgagagatc ggagacgcag 1020  
acacccgag ggaacttagc ctcccgacc gatgcgtgtc ctggcaacgc ctcaagattc 1080  
agcgcaagcg attcaatctt gttacttcca gaaccgaatc acgtccccgt agtgtgcggg 1140  
gagagcgccc gaacgcaggg atggtatcca tgcgccccct ctcttttcga acgagaaccg 1200  
gccggtacag tcaatccgga cacattgtga cgccgttcaa cgattgttgt gctgtgaagg 1260  
attcactcaa gccaaatgat atcgccattc cgttgccgga acatttgacg ccttctccct 1320  
acgagtagaa gccagctgga ccctctttga gccagctcc gatgaaagga atgaggaa 1378  
atg gat ggt atc cac gac aca ggc ggc atg acc gga tac gga ccg gtc 1426  
Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val  
1 5 10 15  
ccc tat cag aag gac gag ccc ttc ttc cac tac gag tgg gag ggt cga 1474  
Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg  
20 25 30  
acc ctg tcg att ctg acc tgg atg cat ctc aag ggc atg tcg tgg tgg 1522  
Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Met Ser Trp Trp  
35 40 45  
gac aag tcg cgg ttc ttc cgg gag tcg atg ggg aac gaa aac tac gtc 1570  
Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val



50	55	60	
aac gag att cgc aac tcg tac tac acc cac tgg ctg agt gcg gcg gaa			1618
Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu			
65	70	75	80
cgt atc ctc gtc gcc gac aag atc atc acc gaa gaa gag cga aag cac			1666
Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His			
85	90	95	
cgc gtg cag gag atc ctc gag ggt cgg tac acg gac agg aac ccg tcg			1714
Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Asn Pro Ser			
100	105	110	
cgg aag ttc gat ccg gcc gag atc gag aag gcg atc gag agg ctt cac			1762
Arg Lys Phe Asp Pro Ala Glu Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His			
115	120	125	
gag ccc cac tcc cta gtg ctt cca gga gcg gag ccg agt ttc tcc ctc			1810
Glu Pro His Ser Leu Val Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu			
130	135	140	
ggt gac aag gtc aaa gtg aag aac atg aac ccg ctg gga cac aca cgg			1858
Gly Asp Lys Val Lys Val Lys Asn Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg			
145	150	155	160
tgc ccg aag tat gtg cgg aac aga atc ggg gaa atc gtc acc tcc cac			1906
Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Arg Ile Gly Glu Ile Val Thr Ser His			
165	170	175	
ggg tgc cag atc tat ccc gag agc agc tcc gcc ggc ctc ggc gac gat			1954
Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp			
180	185	190	
ccc cgc ccg ctc tac acg gtc gcg ttt tcc gcc cag gaa ctg tgg ggc			2002
Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly			





195	200	205	
gac gac gga aac ggg aaa gac gta gtg tgc gtc gat ctc tgg gaa ccg			2050
Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro			
210	215	220	
tac ctg atc tct gcg tga aaggaatcgc ata gtg agc gag cac gtc aat			2099
Tyr Leu Ile Ser Ala	Val Ser Glu His Val Asn		
225	230	5	
aag tac acg gag tac gag gca cgt acc aag gca atc gaa acc ttg ctg			2147
Lys Tyr Thr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr Lys Ala Ile Glu Thr Leu Leu			
10	15	20	
tac gag cga ggg ctc atc acg ccc gcc gcg gtc gac cga gtc gtt tcg			2195
Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala Ala Val Asp Arg Val Val Ser			
25	30	35	
tac tac gag aac gag atc ggc ccg atg ggc ggt gcc aag gtc gtg gcc			2243
Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met Gly Gly Ala Lys Val Val Ala			
40	45	50	
aag tcc tgg gtg gac cct gag tac cgc aag tgg ctc gaa gaa gac gcg			2291
Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg Lys Trp Leu Glu Glu Asp Ala			
55	60	65	70
acg gcc gcg atg gcg tca ttg ggc tat gcc ggc gag cag gca cac cag			2339
Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr Ala Gly Glu Gln Ala His Gln			
75	80	85	
atc tcg gcc gtc ttc aac gac tcc caa aca cat cac gta gtg gtg tgc			2387
Ile Ser Ala Val Phe Asn Asp Ser Gln Thr His His Val Val Val Cys			
90	95	100	
act ctg tgt tcg tgc tat ccg tgg ccg gtg ctt gcc ctc ccg ccc gcc			2435
Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala			



105 110 115

tgg tac aag agc atg gag tac cgg tcc cga gtg gta gca gac cct cgt 2483  
Trp Tyr Lys Ser Met Glu Tyr Arg Ser Arg Val Val Ala Asp Pro Arg  
120 125 130

gga gta ctc aag cgc gat ttc ggg ttc gac atc ccc gat gag gtg gag 2531  
Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe Asp Ile Pro Asp Glu Val Glu  
135 140 145 150

gtc agg gtt tgg gac agc agc tcc gaa atc cgc tac atc gtc atc ccg 2579  
Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Ile Arg Tyr Ile Val Ile Pro  
155 160 165

gaa cgg ccg gcc ggc acc gac ggt tgg tcc gag gac gag ctg gcg aag 2627  
Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp Ser Glu Asp Glu Leu Ala Lys  
170 175 180

ctg gtg agt cgg gac tcg atg atc ggt gtc agt aat gcg ctc aca ccg 2675  
Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly Val Ser Asn Ala Leu Thr Pro  
185 190 195

cag gaa gtg atc gta tga gtgaagacac actcactgat cggtcccgg 2723  
Gln Glu Val Ile Val  
200

cgactgggac cgccgcaccg ccccgcgaca atggcgagct tgtattcacc gagccttggg 2783

aagcaacggc attcggggtc gccatgcgc tttcggatc 2822

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 229

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rhodococcus sp.



&lt;400&gt; 4

Met Asp Gly Ile His Asp Thr Gly Gly Met Thr Gly Tyr Gly Pro Val

1

5

10

15

Pro Tyr Gln Lys Asp Glu Pro Phe Phe His Tyr Glu Trp Glu Gly Arg

20

25

30

Thr Leu Ser Ile Leu Thr Trp Met His Leu Lys Gly Met Ser Trp Trp

35

40

45

Asp Lys Ser Arg Phe Phe Arg Glu Ser Met Gly Asn Glu Asn Tyr Val

50

55

60

Asn Glu Ile Arg Asn Ser Tyr Tyr Thr His Trp Leu Ser Ala Ala Glu

65

70

75

80

Arg Ile Leu Val Ala Asp Lys Ile Ile Thr Glu Glu Glu Arg Lys His

85

90

95

Arg Val Gln Glu Ile Leu Glu Gly Arg Tyr Thr Asp Arg Asn Pro Ser

100

105

110

Arg Lys Phe Asp Pro Ala Glu Ile Glu Lys Ala Ile Glu Arg Leu His

115

120

125

Glu Pro His Ser Leu Val Leu Pro Gly Ala Glu Pro Ser Phe Ser Leu

130

135

140

Gly Asp Lys Val Lys Val Lys Asn Met Asn Pro Leu Gly His Thr Arg

145

150

155

160

Cys Pro Lys Tyr Val Arg Asn Arg Ile Gly Glu Ile Val Thr Ser His

165

170

175

Gly Cys Gln Ile Tyr Pro Glu Ser Ser Ser Ala Gly Leu Gly Asp Asp



180 185 190  
Pro Arg Pro Leu Tyr Thr Val Ala Phe Ser Ala Gln Glu Leu Trp Gly  
195 200 205  
Asp Asp Gly Asn Gly Lys Asp Val Val Cys Val Asp Leu Trp Glu Pro  
210 215 220  
Tyr Leu Ile Ser Ala  
225

<210> 5  
<211> 203  
<212> PRT  
<213> Rhodococcus sp.

<400> 5  
Val Ser Glu His Val Asn Lys Tyr Thr Glu Tyr Glu Ala Arg Thr  
1 5 10 15  
Lys Ala Ile Glu Thr Leu Leu Tyr Glu Arg Gly Leu Ile Thr Pro Ala  
20 25 30  
Ala Val Asp Arg Val Val Ser Tyr Tyr Glu Asn Glu Ile Gly Pro Met  
35 40 45  
Gly Gly Ala Lys Val Val Ala Lys Ser Trp Val Asp Pro Glu Tyr Arg  
50 55 60  
Lys Trp Leu Glu Glu Asp Ala Thr Ala Ala Met Ala Ser Leu Gly Tyr  
65 70 75  
Ala Gly Glu Gln Ala His Gln Ile Ser Ala Val Phe Asn Asp Ser Gln  
80 85 90 95





Thr His His Val Val Val Cys Thr Leu Cys Ser Cys Tyr Pro Trp Pro  
100 105 110

Val Leu Gly Leu Pro Pro Ala Trp Tyr Lys Ser Met Glu Tyr Arg Ser  
115 120 125

Arg Val Val Ala Asp Pro Arg Gly Val Leu Lys Arg Asp Phe Gly Phe  
130 135 140

Asp Ile Pro Asp Glu Val Glu Val Arg Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu  
145 150 155

Ile Arg Tyr Ile Val Ile Pro Glu Arg Pro Ala Gly Thr Asp Gly Trp  
160 165 170 175

Ser Glu Asp Glu Leu Ala Lys Leu Val Ser Arg Asp Ser Met Ile Gly  
180 185 190

Val Ser Asn Ala Leu Thr Pro Gln Glu Val Ile Val  
195 200

<210> 6

<211> 2822

<212> DNA

<213> Rhodococcus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1094).. (2491)

<223> amidase

<400> 6

tgattacgaa ttcgagctcg gtaccggggg atcacttcgg ccagagggtg acggcgaaat 60



cgggcctcga tctccgcgtc cacggcgttg atacgtgtgt cgaggtcgat caccgcctgc 120  
gccaatcgg cgaccagttc ggcagcgaca tcttcccccg gcaaccgcac ggtctgcgcc 180  
ttcgcggcgg tgactgcggc ccgggcgacg gattcggcgt ggcgcacccc ggccccggtg 240  
agcattgcgg ccagtgcggc cgcggcgacg cggcggatcg ctttcggtcg ctggtagcgg 300  
gccagcagca ccaccagcc ccggtccgag gagatctgcg cgacgcgttc gagtccgggg 360  
cagatcgca cgagttgctg acgcagccgg ttgatggccc gggtacggtc ggcgaccaga 420  
tcggtgcggt ggccgggtgag catctgcagc tcacggatca actcgtcgtc gggacgcaga 480  
acgggcaggt ccgaccgat ccgggactga tcggcgatca cccgggcgtc gcgggcgtcg 540  
gtcttggctt cgccgncgcg gtagaccgac gatgcctgcc acaccgaacg tncggacagg 600  
tagcgaccg gtttccggc gtcggccagc acagtcagca acaaggtagc gtaggcggtg 660  
gtcagatcca ccgtccacga caccgtctcg gtgagtgcgt cgatctcggg gatcaccgca 720  
cggatcgttg ctctcgttt gtcacatcg cgcgacagca ccaccgtccc ggaggtgtcg 780  
agtacgcata tccagtgggtg ttctttgccg acgtcgactc ctgccacag ttgcgaaccg 840  
gtcatcggat ttctcgttt tcgcttgtgt tccggcctgg ccccgatgga cgcctncgcc 900  
ggcatttct taaacaagcg atcatgcgca gatctcaatc agcgggtccag aggtgtccag 960  
acaggtcggg tggccagtcc ttcaagccc cactcgagag tgggcaaacc ttatgcagcc 1020  
tcgccggcct gcccggtta cagctcaacg taactctcac gaagtaactg cacctacgaa 1080  
cttaaggaac ctc atg tct tcg ttg act ccc ccc aat tcc aac caa atg 1129



Met Ser Ser Leu Thr Pro Pro Asn Ser Asn Gln Met

1

5

10

tcg gcc ctg aac aac cac ttc cga ttc gga ctg acg acg ccg gaa ctc 1177

Ser Ala Leu Asn Asn His Phe Arg Phe Gly Leu Thr Thr Pro Glu Leu

15

20

25

gaa gag ttc gca ccg gcc ctc gaa ggc acg ctc gcg tcc tcc gaa acc 1225

Glu Glu Phe Ala Pro Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr

30

35

40

gtc gaa cgc ctc tac gag cgc acc gcg ccc gag ccg cct cag cgg tca 1273

Val Glu Arg Leu Tyr Glu Arg Thr Ala Pro Glu Pro Pro Gln Arg Ser

45

50

55

60

tgg acc tca ccc acg gcg gac gag aac ccg ctg agc gcc tgg tac gtc 1321

Trp Thr Ser Pro Thr Ala Asp Glu Asn Pro Leu Ser Ala Trp Tyr Val

65

70

75

acc acc tcg atc agc gaa acc gac gaa ggc ccc ctc gcc ggg cga acg 1369

Thr Thr Ser Ile Ser Glu Thr Asp Glu Gly Pro Leu Ala Gly Arg Thr

80

85

90

gtc gcc gtg aaa gac aac gtc gca gtc gcc ggc gtg ccg atg atg aac 1417

Val Ala Val Lys Asp Asn Val Ala Val Ala Gly Val Pro Met Met Asn

95

100

105

ggc tcc cga acc gtc gag ggc ttc acc ccc cgc tac gac gcc acc gtc 1465

Gly Ser Arg Thr Val Glu Gly Phe Thr Pro Arg Tyr Asp Ala Thr Val

110

115

120

gta cgc cga ctg ctc gac gcc ggc gca acc atc acc ggc aaa gcg gtg 1513

Val Arg Arg Leu Leu Asp Ala Gly Ala Thr Ile Thr Gly Lys Ala Val

125

130

135

140

tgc gaa gat ctc tgc ttc tcc ggc gcc agc ttc act tcc cac ccc cag 1561



Cys Glu Asp Leu Cys Phe Ser Gly Ala Ser Phe Thr Ser His Pro Gln

145

150

155

ccg gtc cgc aac ccc tgg gac gaa agc cgc atc acc ggc ggc tcg tcc 1609

Pro Val Arg Asn Pro Trp Asp Glu Ser Arg Ile Thr Gly Gly Ser Ser

160

165

170

agc ggc agc ggc gcc ctg gtc gcc agc ggc cag gtg gat atg gca gtc 1657

Ser Gly Ser Gly Ala Leu Val Ala Ser Gly Gln Val Asp Met Ala Val

175

180

185

ggc ggc gac cag ggc ggt tcg atc cgc atc ccc gcc gcg ttc tgc ggc 1705

Gly Gly Asp Gln Gly Gly Ser Ile Arg Ile Pro Ala Ala Phe Cys Gly

190

195

200

atc gtc gga cac aaa ccc acc cac gga ctg gtc ccc tat acg gga gca 1753

Ile Val Gly His Lys Pro Thr His Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Ala

205

210

215

220

ttt ccc atc gaa cga acc atc gac cac ctc ggt ccg atg acg cgc acg 1801

Phe Pro Ile Glu Arg Thr Ile Asp His Leu Gly Pro Met Thr Arg Thr

225

230

235

gtc agc gac gcc gcc gca atg ctc acc gtc ctc gcc ggc acc gac ggc 1849

Val Ser Asp Ala Ala Ala Met Leu Thr Val Leu Ala Gly Thr Asp Gly

240

245

250

ctc gat ccc cga cag acc cac cgg atc gaa ccg gtg gac tac ctc gcg 1897

Leu Asp Pro Arg Gln Thr His Arg Ile Glu Pro Val Asp Tyr Leu Ala

255

260

265

gcg ctg gcc gaa ccc gca tcg ggt ctg cgc gtg ggt gtg gtc acc gaa 1945

Ala Leu Ala Glu Pro Ala Ser Gly Leu Arg Val Gly Val Val Thr Glu

270

275

280

ggc ttc gac acc cct gtc tcc gac gct gcc gtc gac aat gcc gtg cgc 1993





Gly Phe Asp Thr Pro Val Ser Asp Ala Ala Val Asp Asn Ala Val Arg  
 285 290 295 300

acc gcc atc ggc gta ctg cgc tcg gcc gga ctt acc gtc gaa gag gtc 2041  
 Thr Ala Ile Gly Val Leu Arg Ser Ala Gly Leu Thr Val Glu Glu Val  
 305 310 315

tcg atc ccc tgg cac ctc gat gcg atg gcc gtc tgg aac gtg atc gac 2089  
 Ser Ile Pro Trp His Leu Asp Ala Met Ala Val Trp Asn Val Ile Asp  
 320 325 330

cgg gcc gac gac gaa ttc gaa gcc ttc ctg ctg cag gtg ctc gac gag 2137  
 Arg Ala Asp Asp Glu Phe Glu Ala Phe Leu Leu Gln Val Leu Asp Glu  
 335 340 345

aac gcc gtc acc atc ccc gaa ctc gga cag gtg cgg gcg cag acg ccg 2185  
 Asn Ala Val Thr Ile Pro Glu Leu Gly Gln Val Arg Ala Gln Thr Pro  
 350 355 360

cgc tcg tgg tgc tca cct cga acc gca ccc gcg agg tgc acg acg ccc 2233  
 Arg Ser Trp Cys Ser Pro Arg Thr Ala Pro Ala Arg Cys Thr Thr Pro  
 365 370 375 380

tca aac gcc gct gcc tgt acc act ggc tcg aac acc ccg acc tcg cgc 2281  
 Ser Asn Ala Ala Ala Cys Thr Thr Gly Ser Asn Thr Pro Thr Ser Arg  
 385 390 395

ggg aag tgg aga tcc tgc gcc gcc gca tcc cgg gca tcg acg aac acc 2329  
 Gly Lys Trp Arg Ser Cys Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Thr Asn Thr  
 400 405 410

tcg cgg cgc agg tcg ccc acg ccg tgc agg cca tgc gcg gga tgg acc 2377  
 Ser Arg Arg Arg Ser Pro Thr Pro Cys Arg Pro Cys Ala Gly Trp Thr  
 415 420 425

tgc tca aac cac ccg ggg tcg cgg agt cgc tgg act ggg cac gag cgc 2425



Cys Ser Asn His Pro Gly Ser Arg Ser Arg Trp Thr Gly His Glu Arg  
430 435 440

tgc ggg aac tcg acc gcg acg tgc tcg acg cga cga ccg cgg ccg cga 2473

Cys Gly Asn Ser Thr Ala Thr Cys Ser Thr Arg Arg Pro Arg Pro Arg  
445 450 455 460

ccc tcg gtg ccg tcc tga agtaccggga ggacctogac cgagtgggcc 2521

Pro Ser Val Pro Ser

465

gcaccgggct cgaccggctc ctgacgggggt gacagcggcg atgacgacga ccaccgacgc 2581

cggggggttcc ctgctcggac tcaccggett caccgcggcc ctgcgcggg ccggcctgtc 2641

cgctgcctcg gacgccaccg tggcctacct gcgcgccctg cgcgagatcg acctcggcga 2701

ccgcgcgcag gtgtactggg ccgggcgcgc caccctgtgc caccaccccg acgacatccc 2761

ccgctacgac ctgcgcttcg agagctgggt cggcggaacg gcaccgcacg tgacgtcgcc 2821

g

2822

<210> 7

<211> 465

<212> PRT

<213> Rhodococcus sp.

<400> 7

Met Ser Ser Leu Thr Pro Pro Asn Ser Asn Gln Met Ser Ala Leu Asn

1

5

10

15

Asn His Phe Arg Phe Gly Leu Thr Thr Pro Glu Leu Glu Glu Phe Ala

20

25

30



Pro Ala Leu Glu Ala Thr Leu Ala Ser Ser Glu Thr Val Glu Arg Leu  
35 40 45

Tyr Glu Arg Thr Ala Pro Glu Pro Pro Gln Arg Ser Trp Thr Ser Pro  
50 55 60

Thr Ala Asp Glu Asn Pro Leu Ser Ala Trp Tyr Val Thr Thr Ser Ile  
65 70 75 80

Ser Glu Thr Asp Glu Gly Pro Leu Ala Gly Arg Thr Val Ala Val Lys  
85 90 95

Asp Asn Val Ala Val Ala Gly Val Pro Met Met Asn Gly Ser Arg Thr  
100 105 110

Val Glu Gly Phe Thr Pro Arg Tyr Asp Ala Thr Val Val Arg Arg Leu  
115 120 125

Leu Asp Ala Gly Ala Thr Ile Thr Gly Lys Ala Val Cys Glu Asp Leu  
130 135 140

Cys Phe Ser Gly Ala Ser Phe Thr Ser His Pro Gln Pro Val Arg Asn  
145 150 155 160

Pro Trp Asp Glu Ser Arg Ile Thr Gly Gly Ser Ser Ser Gly Ser Gly  
165 170 175

Ala Leu Val Ala Ser Gly Gln Val Asp Met Ala Val Gly Gly Asp Gln  
180 185 190

Gly Gly Ser Ile Arg Ile Pro Ala Ala Phe Cys Gly Ile Val Gly His  
195 200 205

Lys Pro Thr His Gly Leu Val Pro Tyr Thr Gly Ala Phe Pro Ile Glu  
210 215 220



Arg Thr Ile Asp His Leu Gly Pro Met Thr Arg Thr Val Ser Asp Ala  
225 230 235 240

Ala Ala Met Leu Thr Val Leu Ala Gly Thr Asp Gly Leu Asp Pro Arg  
245 250 255

Gln Thr His Arg Ile Glu Pro Val Asp Tyr Leu Ala Ala Leu Ala Glu  
260 265 270

Pro Ala Ser Gly Leu Arg Val Gly Val Val Thr Glu Gly Phe Asp Thr  
275 280 285

Pro Val Ser Asp Ala Ala Val Asp Asn Ala Val Arg Thr Ala Ile Gly  
290 295 300

Val Leu Arg Ser Ala Gly Leu Thr Val Glu Glu Val Ser Ile Pro Trp  
305 310 315 320

His Leu Asp Ala Met Ala Val Trp Asn Val Ile Asp Arg Ala Asp Asp  
325 330 335

Glu Phe Glu Ala Phe Leu Leu Gln Val Leu Asp Glu Asn Ala Val Thr  
340 345 350

Ile Pro Glu Leu Gly Gln Val Arg Ala Gln Thr Pro Arg Ser Trp Cys  
355 360 365

Ser Pro Arg Thr Ala Pro Ala Arg Cys Thr Thr Pro Ser Asn Ala Ala  
370 375 380

Ala Cys Thr Thr Gly Ser Asn Thr Pro Thr Ser Arg Gly Lys Trp Arg  
385 390 395 400

Ser Cys Ala Ala Ala Ser Arg Ala Ser Thr Asn Thr Ser Arg Arg Arg  
405 410 415





Ser Pro Thr Pro Cys Arg Pro Cys Ala Gly Trp Thr Cys Ser Asn His  
420 425 430

Pro Gly Ser Arg Ser Arg Trp Thr Gly His Glu Arg Cys Gly Asn Ser  
435 440 445

Thr Ala Thr Cys Ser Thr Arg Arg Pro Arg Pro Arg Pro Ser Val Pro  
450 455 460

Ser  
465



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07464

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/55, C12N1/21, C12N9/78,  
C12P13/02, C07K14/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/55, C12N1/21, C12N9/78,  
C12P13/02, C07K14/37

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS  
(DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP, 7-99980, A (JAPAN ENERGY CORP), 18 April, 1995 (18.04.95), sequence Nos. 1,5 (Family: none)	12-22, 24, 25 23 1-11
X Y A	Michihiki Kobayashi et al., "Nitrilase from Rhodococcus rhodochrous J1," THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1992) Vol.267, No.29, pp. 20746-20751, Fig.2	12-22, 24, 25 23 1-11
X Y A	EP, 445646, A (NITTO CHEM IND CO LTD), 11 September, 1991 (11.09.91), sequence Nos. 1,2,4&AU,9171293,A & CA, 2037291, A & JP, 4-211379, A & DE, 69119454, E & KR, 9502004, B1 & US, 5753472, A	26, 27, 32, 35, 36, 41, 42, 47, 48, 54, 56 30, 31, 34, 39, 40, 45, 46, 49, 55, 58 1-11
X Y	Michiko KOBAYASHI et al., "Amidase coupled with low-molecular-mass nitrile hydratase from Rhodococcus rhodochrous J1," Eur. J. Biochem. (1993) Vol.217, No.1 pp.327-336, Fig.3	28, 29, 33, 37, 38, 43, 44, 50, 51, 53, 57 30, 31, 34, 39, 40, 45, 46, 52, 55, 58

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means  
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  
 "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
18 January, 2001 (18.01.01)

Date of mailing of the international search report  
30 January, 2001 (30.01.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07464

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A		1-11
Y	US, 4629700, A (Standard Oil Company),	12-58
A	16 December, 1986 (16.12.86) (Family: none)	1-11
Y	Jonathan Hughes et al., "Application of whole cell	12-58
A	rhodococcal biocatalysts in acrylic polymer manufacture," Antonie van Leeuwenhoek (1998) Vol.74 No.1-3, pp.107-118	1-11

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07464

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The "special technical feature" of claim 1 relates to using a novel rhodococcus lacking or proposing an ability to convert cyano into amido as a constitution of converting nitrile compounds into carboxylic acids.

The "special technical feature" of claims 12 to 58 relates to clarifying a nitrilase gene, a nitrilehydratase gene and an amidase gene originating in a rhodococcus publicly known as a bacterium capable of converting nitrile compounds into carboxylic acids and producing carboxylic acids or amides by using the same.

It does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical feature. Such being the case, these two groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N15/55, C12N1/21, C12N9/78,  
C12P13/02, C07K14/37

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> C12N15/09, C12N15/55, C12N1/21, C12N9/78,  
C12P13/02, C07K14/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	JP, 7-99980, A (JAPAN ENERGY CORP) 18.4月.1995(18.04.95) 配列番号1, 5 (ファミリーなし)	12-22, 24, 25/ 23/ 1-11
X/Y/A	Michihiki Kobayashi et al. "Nitrilase from Rhodococcus rhodochrous J1" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1992) Vol.267 No.29 p20746-20751 Fig.2	12-22, 24, 25/ 23/ 1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.01.01

国際調査報告の発送日

30.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子



4N

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	EP, 445646, A (NITTO CHEM IND CO LTD) 11.9月.1991(11.09.91) 配列番号 1, 2, 4&AU, 9171293,A &CA, 2037291,A &JP, 4-21137 9,A &DE, 69119454,E &KR, 9502004,B1 &US, 5753472,A	26, 27, 32, 35, 36, 41, 42, 47, 48, 54, 56/ 30, 31, 34, 39, 40, 45, 46, 49, 55, 58/ 1-11
X/Y/A	Michiko KOBAYASHI et al. "Amidase coupled with low-molecular -mass nitrile hydratase from Rhodococcus rhodochrous J1" Eur. J. Biochem. (1993) Vol.217 No.1 p327-336 Fig.3	28, 29, 33, 37, 38, 43, 44, 50, 51, 53, 57/ 30, 31, 34, 39, 40, 45, 46, 52, 55, 58/ 1-11
Y/A	US, 4629700, A (Standard Oil Company) 16.12月.1986(16.12.86) (ファミリーなし)	12-58/ 1-11
Y/A	Jonathan Hughes et al. "Application of whole cell rhodococcal biocatalysts in acrylic polymer manufacture" Antonie van Leeuwenhoek (1998) Vol.74 No.1-3 p107-118	12-58/ 1-11



## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1の「特別な技術的特徴」はニトリル化合物をカルボン酸類に変換する構成として、シアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または提言した新規ロドコッカス属最近を使用する点に関し、

請求の範囲12-58の「特別な技術的特徴」はニトリル化合物をカルボン酸類に変換する能力を有する最近として公知のロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子、ニトリルヒドラーゼ遺伝子及びアミダーゼ遺伝子を明らかにし、それらを用いてカルボン酸類またはアミド類を製造する点に関するものである。

これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係がないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07464

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/55, C12N1/21, C12N9/78,  
C12P13/02, C07K14/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/55, C12N1/21, C12N9/78,  
C12P13/02, C07K14/37

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS  
(DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP, 7-99980, A (JAPAN ENERGY CORP), 18 April, 1995 (18.04.95), sequence Nos. 1,5 (Family: none)	12-22, 24, 25 23 1-11
X Y A	Michihiki Kobayashi et al., "Nitrilase from Rhodococcus rhodochrous J1," THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1992) Vol.267, No.29, pp. 20746-20751, Fig.2	12-22, 24, 25 23 1-11
X Y A	EP, 445646, A (NITTO CHEM IND CO LTD), 11 September, 1991 (11.09.91), sequence Nos. 1,2,4&AU,9171293,A & CA, 2037291, A & JP, 4-211379, A & DE, 69119454, E & KR, 9502004, B1 & US, 5753472, A	26, 27, 32, 35, 36, 41, 42, 47, 48, 54, 56 30, 31, 34, 39, 40, 45, 46, 49, 55, 58 1-11
X Y	Michiko KOBAYASHI et al., "Amidase coupled with low-molecular-mass nitrile hydratase from Rhodococcus rhodochrous J1," Eur. J. Biochem. (1993) Vol.217, No.1 pp.327-336, Fig.3	28, 29, 33, 37, 38, 43, 44, 50, 51, 53, 57 30, 31, 34, 39, 40, 45, 46, 52, 55, 58

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
18 January, 2001 (18.01.01)

Date of mailing of the international search report  
30 January, 2001 (30.01.01)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer



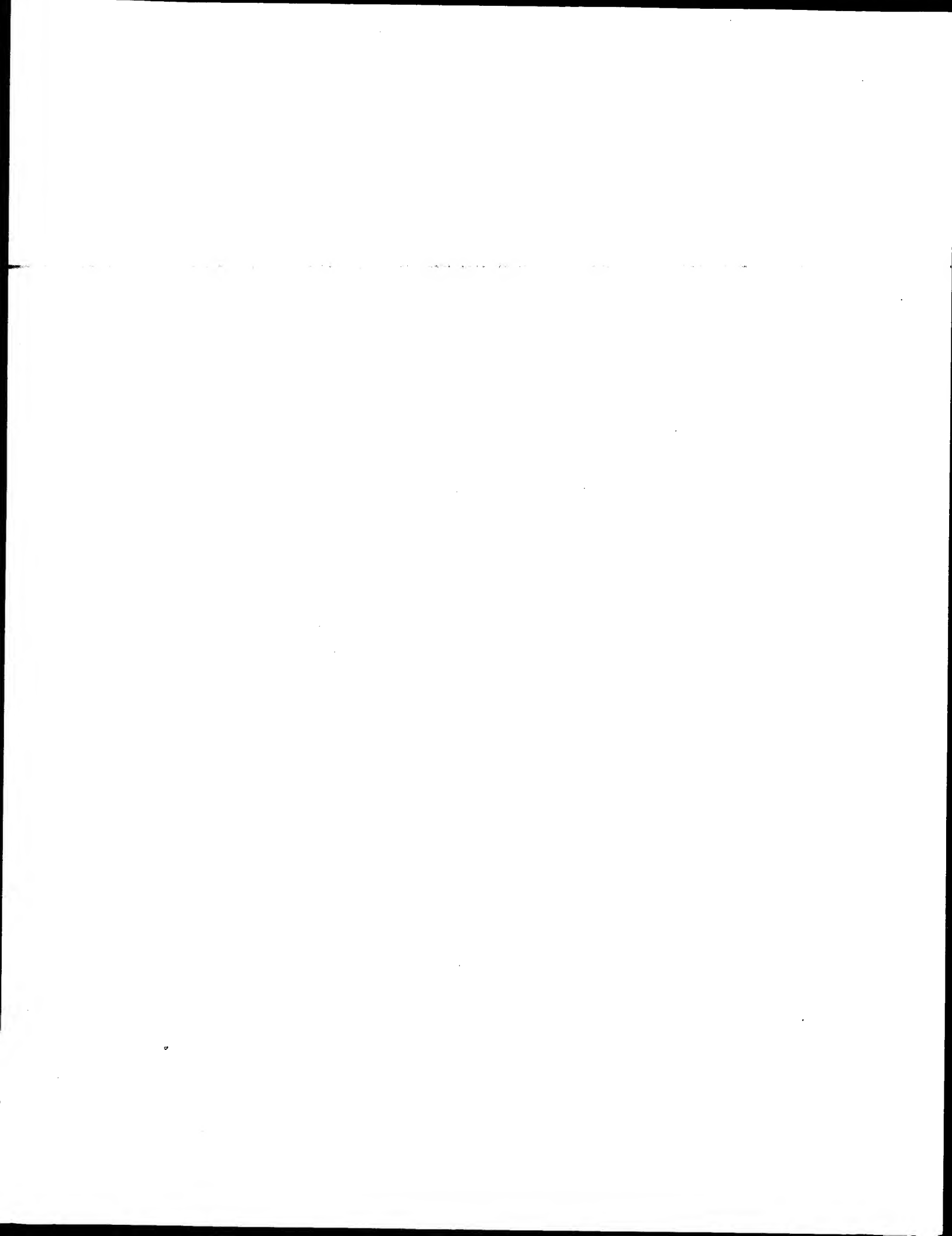
## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. 7

PCT/JP00/07464

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A		1-11
Y	US, 4629700, A (Standard Oil Company),	12-58
A	16 December, 1986 (16.12.86) (Family: none)	1-11
Y	Jonathan Hughes et al., "Application of whole cell	12-58
A	rhodococcal biocatalysts in acrylic polymer manufacture," Antonie van Leeuwenhoek (1998) Vol.74 No.1-3, pp.107-118	1-11



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/07464

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The "special technical feature" of claim 1 relates to using a novel rhodococcus lacking or proposing an ability to convert cyano into amido as a constitution of converting nitrile compounds into carboxylic acids.

The "special technical feature" of claims 12 to 58 relates to clarifying a nitrilase gene, a nitrilehydratase gene and an amidase gene originating in a rhodococcus publicly known as a bacterium capable of converting nitrile compounds into carboxylic acids and producing carboxylic acids or amides by using the same.

It does not appear that there is a technical relationship between these groups of inventions involving one or more of the same or corresponding special technical feature. Such being the case, these two groups of inventions are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

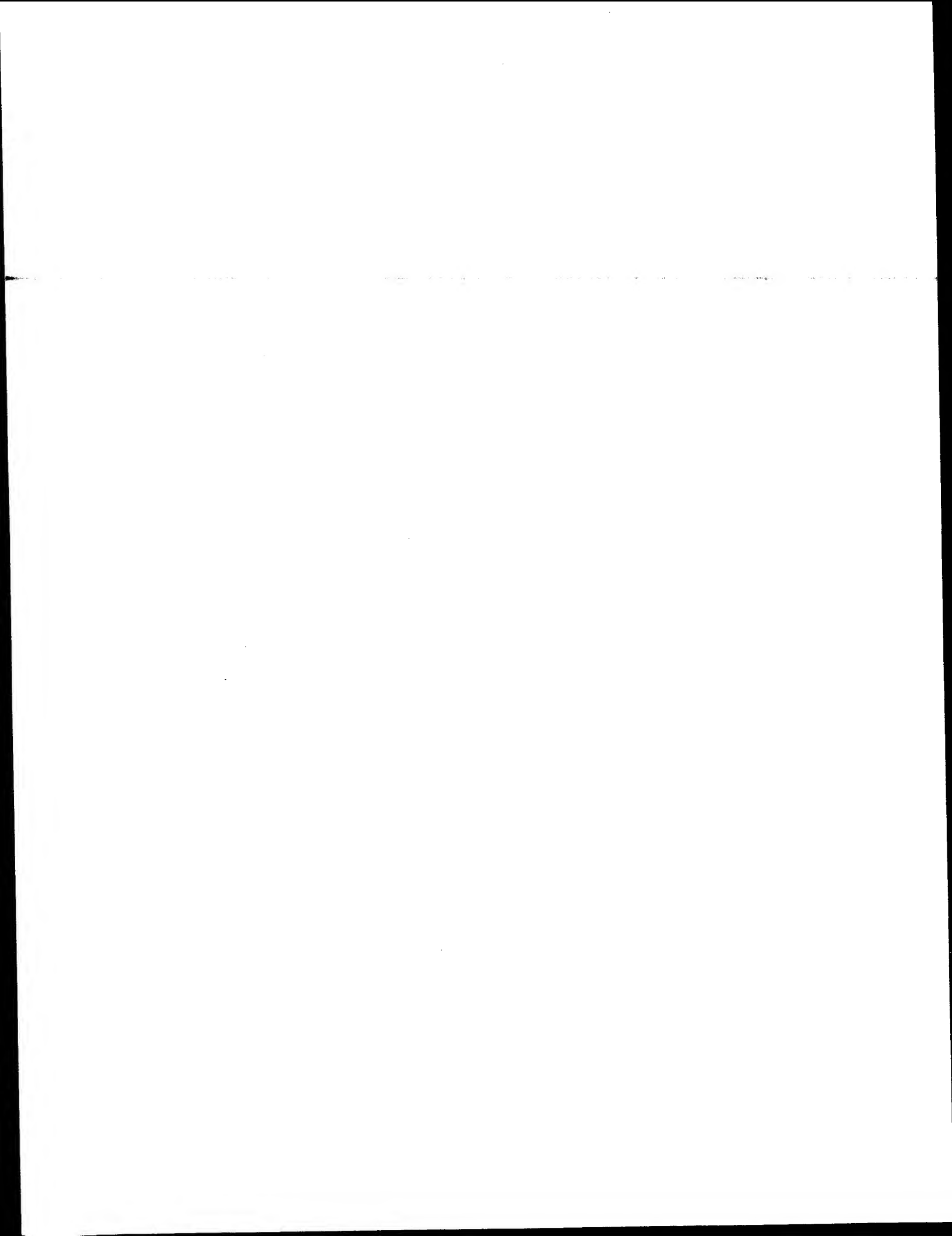
Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒

No protest accompanied the payment of additional search fees.





## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 PC-8404	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JP00/07464	国際出願日 (日.月.年) 25.10.00	優先日 (日.月.年) 26.10.99	
出願人(氏名又は名称)  昭和電工株式会社			

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☒ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

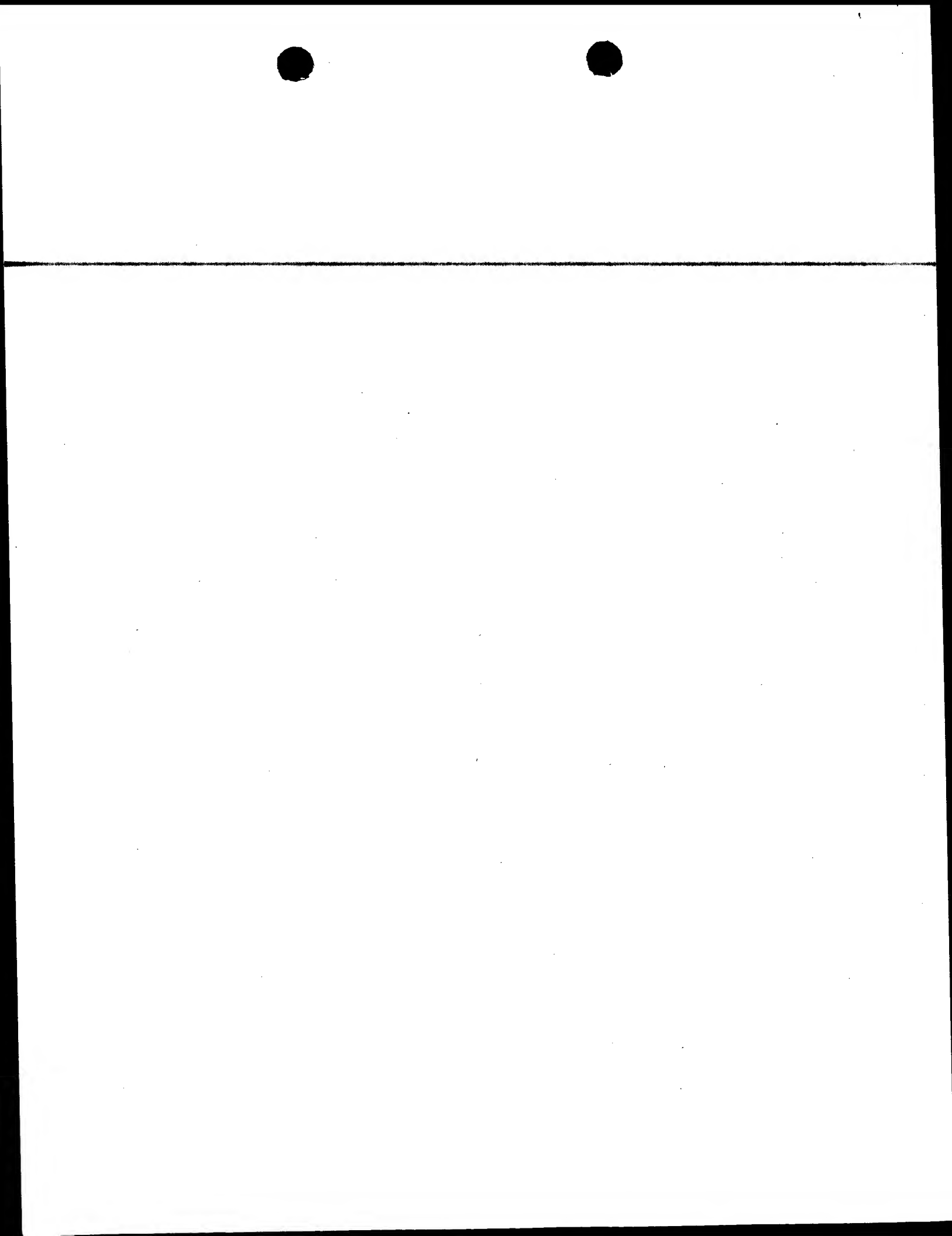
6. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1の「特別な技術的特徴」はニトリル化合物をカルボン酸類に変換する構成として、シアノ基をアミド基に変換する能力を欠損または提言した新規ロドコッカス属最近を使用する点に関し、

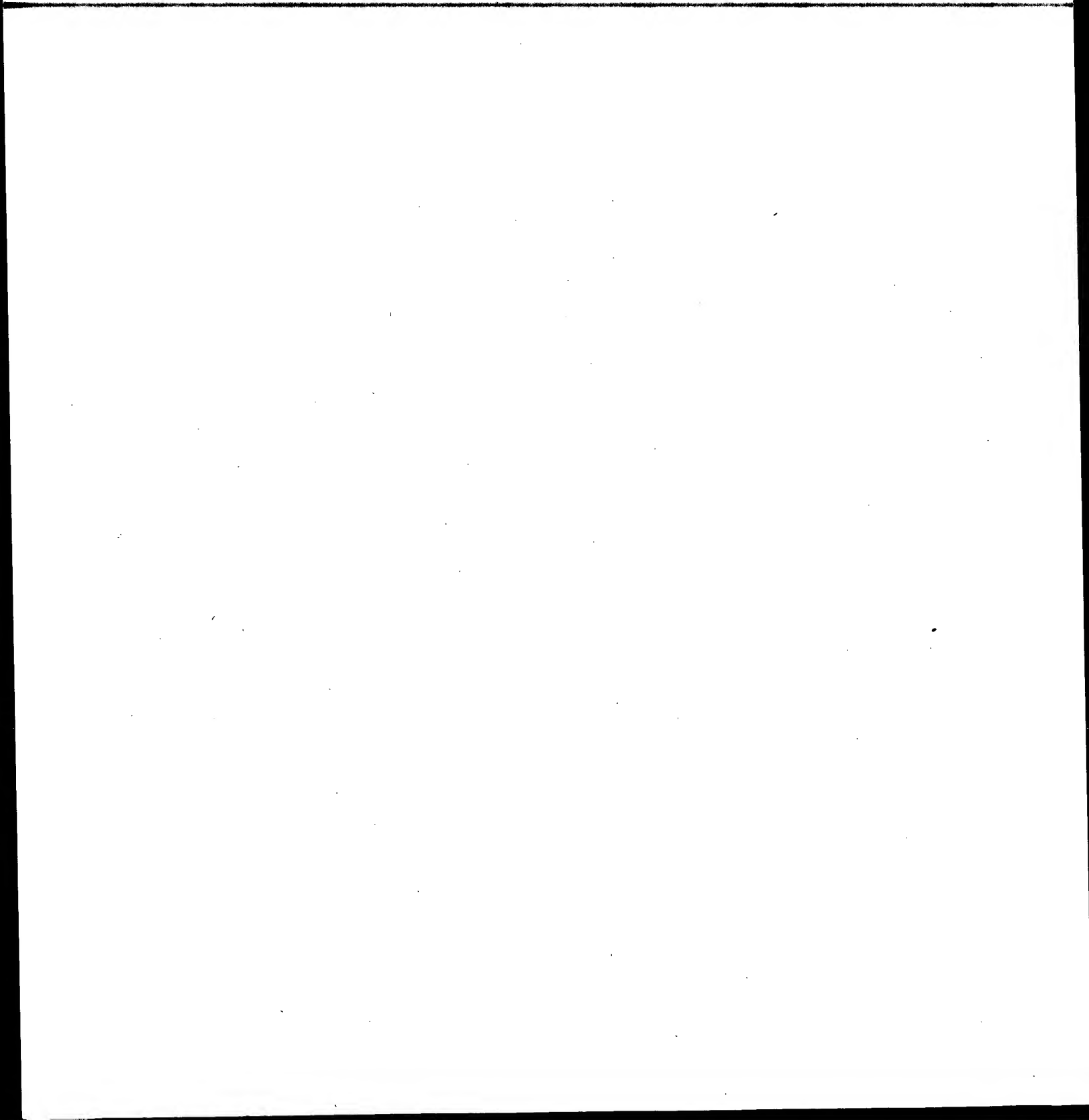
請求の範囲12-58の「特別な技術的特徴」はニトリル化合物をカルボン酸類に変換する能力を有する最近として公知のロドコッカス属細菌由来のニトリラーゼ遺伝子、ニトリルヒドラターゼ遺伝子及びアミダーゼ遺伝子を明らかにし、それらを用いてカルボン酸類またはアミド類を製造する点に関するものである。

これらの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないから、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/55, C12N1/21, C12N9/78,  
C12P13/02, C07K14/37

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N15/55, C12N1/21, C12N9/78,  
C12P13/02, C07K14/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	JP, 7-99980, A (JAPAN ENERGY CORP) 18.4月.1995(18.04.95) 配列番号 1, 5 (ファミリーなし)	12-22, 24, 25/ 23/ 1-11
X/Y/A	Michihiki Kobayashi et al. "Nitrilase from Rhodococcus rhodochrous J1" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1992) Vol. 267 No. 29 p20746-20751 Fig. 2	12-22, 24, 25/ 23/ 1-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.01.01

国際調査報告の発送日

30.01.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子



4N

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



## C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	EP, 445646, A (NITTO CHEM IND CO LTD) 11.9月.1991(11.09.91) 配列番号 1, 2, 4&AU, 9171293, A &CA, 2037291, A &JP, 4-21137 9, A &DE, 69119454, E &KR, 9502004, B1 &US, 5753472, A	26, 27, 32, 35, 36, 41, 42, 47, 48, 54, 56/ 30, 31, 34, 39, 40, 45, 46, 49, 55, 58/ 1-11
X/Y/A	Michiko KOBAYASHI et al. "Amidase coupled with low-molecular -mass nitrile hydratase from Rhodococcus rhodochrous J1" Eur. J. Biochem. (1993) Vol.217 No.1 p327-336 Fig.3	28, 29, 33, 37, 38, 43, 44, 50, 51, 53, 57/ 30, 31, 34, 39, 40, 45, 46, 52, 55, 58/ 1-11
Y/A	US, 4629700, A (Standard Oil Company) 16.12月.1986(16.12.86) (ファミリーなし)	12-58/ 1-11
Y/A	Jonathan Hughes et al. "Application of whole cell rhodococcal biocatalysts in acrylic polymer manufacture" Antonie van Leeuwenhoek (1998) Vol.74 No.1-3 p107-118	12-58/ 1-11





P<sup>A</sup>TENT COOPERATION TREATY

4

PCT

NOTIFICATION CONCERNING  
SUBMISSION OR TRANSMITTAL  
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

SHIGA, Masatake  
OR Building  
23-3, Takadanobaba 3-chome  
Shinjuku-ku  
Tokyo 169-8925  
JAPON

01.1.22

Date of mailing (day/month/year) 12 January 2001 (12.01.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PC-8404	
International application No. PCT/JP00/07464	International filing date (day/month/year) 25 October 2000 (25.10.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 26 October 1999 (26.10.99)
Applicant SHOWA DENKO K.K. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(\*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
26 Octo 1999 (26.10.99)	11/303212	JP	15 Dece 2000 (15.12.00)
26 Janu 2000 (26.01.00)	2000/21797	JP	08 Dece 2000 (08.12.00)
10 Apri 2000 (10.04.00)	2000/107855	JP	08 Dece 2000 (08.12.00)

The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

S. Mandallaz

